

**Untersuchungen zur Expression  
prokaryotischer Erbinformation  
im Schimmelpilz *Neurospora crassa***

**Johanna Teifel**

**1976**



Untersuchungen zur Expression prokaryotischer  
Erbinformation im Schimmelpilz  
*Neurospora crassa*

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität, München



vorgelegt von

Johanna Teifel

aus

Kirchweidach

1976

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von  
Januar 1973 bis September 1975 am Genetischen  
Institut der Universität München unter der  
Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Klingmüller  
durchgeführt.



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Klingmüller
  2. Berichterstatter: Priv.Doiz. Dr. H. Schmieger
- Tag der mündlichen Prüfung: 21.5.1976

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                        |        |
|------------------------------------------------------------------------|--------|
| EINLEITUNG . . . . .                                                   | 1 - 4  |
| MATERIAL UND METHODEN . . . . .                                        | 5 - 36 |
| 1. Stämme . . . . .                                                    | 5      |
| 2. Nährböden . . . . .                                                 | 6      |
| 3. Puffer und Lösungen . . . . .                                       | 9      |
| 4. Scintillationsflüssigkeit . . . . .                                 | 12     |
| 5. Besondere Chemikalien . . . . .                                     | 12     |
| 6. Radioaktive Substanzen . . . . .                                    | 12     |
| 7. Glasfaserfilter und Dialyseschläuche . . . . .                      | 12     |
| 8. Anzuchtverfahren zur Gewinnung von Konidien . . . . .               | 13     |
| 9. Herstellung von Konidiensuspensionen . . . . .                      | 13     |
| 10. Plattierung von Konidien . . . . .                                 | 13     |
| 11. Ankeimung von Konidien . . . . .                                   | 13     |
| 12. Kreuzungen . . . . .                                               | 13     |
| 13. Plattierung von Sporen . . . . .                                   | 13     |
| 14. Isolation von Einzelsporen . . . . .                               | 14     |
| 15. Herstellung von Doppelmutanten . . . . .                           | 15     |
| 16. Herstellung von Bakteriensuspensionen . . . . .                    | 16     |
| 17. Gewinnung von Phagenlysaten . . . . .                              | 16     |
| 18. Anreicherung und Reinigung der Phagen . . . . .                    | 18     |
| 19. Titration der Phagen . . . . .                                     | 18     |
| 20. Transduktionstest . . . . .                                        | 19     |
| 21. Gewinnung von $\lambda$ ptrp-DNS . . . . .                         | 19     |
| 22. Herstellung von geschlossener $\lambda$ Ring-DNS . . . . .         | 20     |
| 23. Herstellung von $\lambda$ ptrp-"Hershey circles" . . . . .         | 21     |
| 24. Gewinnung von $^3\text{H}$ -markierter Bakterien-DNS . . . . .     | 21     |
| 25. Gewinnung von radioaktiv-markierter<br>Neurospora-DNS . . . . .    | 22     |
| 26. Bestimmung des Reinheitsgrades der DNS-<br>Präparationen . . . . . | 22     |

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 27. Konzentrationsbestimmung der DNS-<br>Präparationen . . . . .                                                                  | 23 |
| 28. Zentrifugation der DNS im neutralen CsCl-<br>Dichtegradienten . . . . .                                                       | 23 |
| 29. Zentrifugation der DNS im neutralen<br>5-20%igen Sucrose-Gradienten . . . . .                                                 | 23 |
| 30. Zentrifugation der DNS im alkalischen<br>5-20%igen Sucrose-Gradienten . . . . .                                               | 24 |
| 31. Auswertung der Gradienten . . . . .                                                                                           | 24 |
| 32. Molekulargewichtsbestimmung der $\lambda$ ptrp-DNS                                                                            | 24 |
| 33. Dichtebestimmung der DNS . . . . .                                                                                            | 25 |
| 34. Inkubation von Neurosporazellen mit Phagen                                                                                    | 25 |
| 35. Nachweis von Phagen in Neurosporazellen . .                                                                                   | 26 |
| 36. Herstellung von Phagen-Antikörpern . . . .                                                                                    | 27 |
| 37. Titration der Phagen-Antikörper . . . . .                                                                                     | 28 |
| 38. Messung der Phagen-Inaktivierung im<br>Neurospora -Kulturmedium . . . . .                                                     | 28 |
| 39. Messung der Phagen-Inaktivierung in den<br>Neurosporazellen . . . . .                                                         | 29 |
| 40. Abbau von Phagen-DNS in Neurospora-<br>Extrakten . . . . .                                                                    | 29 |
| 41. Messung des Abbaus von Phagen-DNS in<br>verschiedenen Neurospora-Kulturmedien . . .                                           | 30 |
| 42. Nachweis von $^3\text{H}$ -markierter $\lambda$ ptrp-DNS in<br>den Neurosporazellen . . . . .                                 | 30 |
| 43. Verteilung der Radioaktivität in den Neu-<br>rosporazellen nach Inkubation mit<br>$^3\text{H}$ - $\lambda$ ptrp-DNS . . . . . | 31 |
| 44. Versuche zur Ausprägung prokaryotischer Erb-<br>information in den Neurosporazellen . . . .                                   | 32 |
| 45. Einfluß von Tryptophan im Anzuchtmedium auf<br>die Stabilität der Tryptophanprototrophie                                      | 34 |
| 46. Genetische Analyse der $\text{tryp}^+$ -Isolate . . .                                                                         | 34 |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 47. Einfluß der Phagen auf die Keimungsrate<br>von Wildtypkonidien . . . . . | 35 |
| 48. Statistische Sicherung . . . . .                                         | 36 |

|                      |         |
|----------------------|---------|
| ERGEBNISSE . . . . . | 37 - 92 |
|----------------------|---------|

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Behandlung von Neurosporazellen mit<br>Phagen . . . . .                                                                                       | 37 |
| 1.1. Messung der Inaktivierung von Phagen im<br>Neurospora-Kulturmedium . . . . .                                                                | 37 |
| 1.2. Nachweis von Phagen in den Neurospora-<br>zellen . . . . .                                                                                  | 38 |
| 1.2.1. Nachweis von intrazellulären Phagen in<br>enzymbehandelten Neurosporazellen . . . .                                                       | 39 |
| 1.2.2. Nachweis von intrazellulären Phagen in<br>phagenantiserumbehandelten Neurospora-<br>zellen . . . . .                                      | 42 |
| 1.3. Bestimmung der Phagenanzahl in den Neu-<br>rosporazellen . . . . .                                                                          | 44 |
| 1.4. Bestimmung der Phageninaktivierung in den<br>Neurosporazellen . . . . .                                                                     | 44 |
| 2. Aufnahme von Phagen-DNS in Neurosporazellen                                                                                                   | 46 |
| 2.1. Qualität der Phagen-DNS . . . . .                                                                                                           | 46 |
| 2.2. Bestimmung der Abbaurrate von Phagen-DNS<br>in verschiedenen Inkubationmedien . . . .                                                       | 48 |
| 2.3. Bestimmung der Abbaurrate von Phagen-DNS<br>in Neurosporaextrakten . . . . .                                                                | 50 |
| 2.4. Nachweis von $\lambda$ DNS in den Neurosporazellen                                                                                          | 58 |
| 2.5. Verteilung der Radioaktivität in $^3\text{H}$ - $\lambda$ ptrp-<br>DNS behandelten Neurosporazellen . . . . .                               | 59 |
| 2.6. Dichtebestimmung von $^3\text{H}$ -markierter DNS,<br>isoliert aus $^3\text{H}$ - $\lambda$ DNS inkubierten Neuros-<br>porazellen . . . . . | 61 |

|                                                                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3. Versuche zur Expression bakterieller Erb-<br>information in den Neurospora zellen . . . . .                                                   | 66        |
| 4. Charakterisierung der tryptophanprototrophen<br>Isolate . . . . .                                                                             | 72        |
| 4.1. Prüfung der Stabilität der tryptophanproto-<br>trophen Isolate . . . . .                                                                    | 72        |
| 4.2. Genetische Analyse der instabilen Isolate .                                                                                                 | 72        |
| 4.3. Differentielle Plattierung der stabilen<br>tryptophanprototrophen Isolate . . . . .                                                         | 75        |
| 4.4. Prüfung der Tryptophanprototrophie in den<br>vegetativen Subkulturen . . . . .                                                              | 79        |
| 4.5. Einfluß von Tryptophan im Anzuchtmedium<br>auf die Rate der $\text{tryp}^+$ -Zellen bei hetero-<br>karyotischen Isolaten . . . . .          | 80        |
| 4.6. Genetische Analyse der stabilen tryptophan-<br>prototrophen Isolate . . . . .                                                               | 80        |
| 4.6.1. Kreuzung der stabilen $\text{tryp}^+$ -Isolate mit<br>der Mutante $\text{tryp}-1$ . . . . .                                               | 82        |
| 4.6.2. Reziproke Kreuzung der nicht Mendelsch<br>aufspaltenden $\text{tryp}^+$ -Isolate . . . . .                                                | 86        |
| 4.6.3. Kreuzung der Mendelsch aufspaltenden $\text{tryp}^+$<br>Isolate mit dem Wildtyp . . . . .                                                 | 87        |
| 4.7. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Ver-<br>suchen zur Expression bakterieller Erbin-<br>formation in <i>Neurospora crassa</i> . . . . . | 90        |
| 5. Bestimmung der Keimungsrate von Wildtypkoni-<br>dien nach Behandlung von Wildtypmycel mit<br>$\lambda_{\text{ptrp}}$ -Phagen . . . . .        | 91        |
| DISKUSSION . . . . .                                                                                                                             | 93 - 106  |
| ZUSAMMENFASSUNG . . . . .                                                                                                                        | 107 - 108 |
| LITERATURVERZEICHNIS . . . . .                                                                                                                   | 109 - 115 |

## A. EINLEITUNG.

Genetische Defekte von Bakterien lassen sich durch Transduktion mit geeigneten Phagen korrigieren (Zinder und Lederberg, 1952). Einen ersten Hinweis darauf, daß Genkorrekturen mittels Bakteriophagen auch über Artgrenzen hinaus durchgeführt werden können, lieferten 1971 die Untersuchungen von Merrill und Mitarbeitern. Die Autoren verwendeten für ihre Experimente  $\lambda$  Phagen, die die Strukturgene für die galaktoseabbauenden Enzyme ihres natürlichen Wirtes *E. coli* enthielten. Als Informationsempfänger dienten, an Stelle von Bakterien, Kulturen menschlicher Fibroblasten mit einem genetischen Block in der Synthese eines dieser Enzyme, der Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase. In den phageninfizierten Fibroblastenzellen wurde durch Enzymtests eine Transferaseaktivität nachgewiesen, die deutlich über der nicht infizierter Zellen lag.

Auch über die phänotypische Kompensation genetischer Defekte von pflanzlichen Zellen durch Behandlung mit transduzierenden Phagen liegen Berichte vor. Johnson et al. (1973) benutzten als Genrezeptoren Zellkulturen von *Acer pseudoplatanus*, die Galaktose nicht verwerten können. Doy et al. (1973a und b) arbeiteten mit haploiden Kalli von *Lysopersicon esculentum*, die bei Kultivierung auf Galaktose- oder Lactosemedium absterben. Beide Forschergruppen beobachteten nach Inkubation der Zellen mit  $\lambda$  und  $\phi 80$ -Phagen, in deren Genom das Lactose- bzw. Galaktoseoperon von *E. coli* integriert war, Wachstum auf Medium mit den erwähnten Zuckern als einzige Kohlenstoffquelle. Darüber hinaus wiesen Doy et al. (1973b) durch immunologische Tests in den Zellen, die auf Lactosemedium wachstumsfähig waren, *E. coli* spezifische  $\beta$ -Galaktosidase nach.

Die bisher verwendeten Empfänger sind zwar zur Erkennung phänotypischer Genexpressionen und für biochemische Unter-

suchungen geeignet, genetische Untersuchungen verursachen hier aber Schwierigkeiten. Doch gerade solche Untersuchungen sind von Bedeutung, da sie Aufschluß über den Ort und die Stabilität des etwaigen Einbaus der Fremdinformation im zelleigenen Genom geben könnten. Informationen darüber sind besonders dann wichtig, wenn man daran denkt Gentransplantationen einmal in der Praxis anzuwenden. Es schien daher sinnvoll, interspezifische Genübertragungen bei einem genetisch leichter zu handhabenden Empfänger näher zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde dazu der Schimmelpilz *Neurospora crassa* gewählt, der sich aus folgenden Gründen für diesen Zweck besonders eignet:

- Er ist ein Eukaryont, bei dem jedoch alle Vorteile mikrobiologischer Arbeitstechniken genützt werden können.
- In biochemischer und genetischer Hinsicht gehört er zu den best untersuchten biologischen Objekten.
- Auf Grund seines haploiden Chromosomensatzes wird das Erkennen von Genexpressionen erleichtert.
- Kreuzungen sind technisch einfach durchzuführen.
- Die Kreuzungsprodukte - Ascosporen - werden in großer Anzahl gebildet.
- Reziproke Kreuzungen ein und desselben Stammes mit einem Testerstamm können zur Erkennung extrachromosomal vererbter Eigenschaften herangezogen werden.

In einem ersten Hauptteil der vorliegenden Arbeit sollte zunächst eine Methode entwickelt werden um Bakteriophagen in die für sie unspezifischen Zellen von *Neurospora crassa* einzubringen. Eine Aufnahme der verwendeten  $\lambda$  Phagenpartikel durch die Zellwandporen, deren Durchmesser ca.  $0,005\mu$  beträgt (Manocha et al., 1967), ist auf Grund des

10 mal größeren Phagenkopfdurchmessers nicht möglich. In Anlehnung an die Versuche von Lhoas (1972) wurde deshalb versucht die Partikel während der Fusion verschiedener *Neurospora*-Stämme vom selben Paarungstyp einzuschleusen. Bei diesem Vorgang, der auch als Heterokaryosis bezeichnet wird, kommt es zur lokalen Auflösung der Zellwand im Fusionsbereich, sodaß ein Eindringen der Phagen in diesem Stadium denkbar ist. Biologische Nachweismethoden sollten darüber Auskunft geben.

In einem zweiten Hauptteil sollte geprüft werden, ob Stoffwechseldefekte von *Neurospora crassa* durch die entsprechenden bakteriellen Gene korrigiert werden können. Dazu wurden tryptophanuxotrophe Stämme mit  $\lambda$ ptrp-Phagen bzw. deren DNS behandelt. Zur Bildung von Tryptophan aus Chorisminsäure sind bei *Neurospora crassa* und *E. coli* 5 identische Syntheseschritte nötig. Die dazu erforderlichen Enzyme werden bei *Neurospora crassa* durch 4 auf verschiedenen Kopplungsgruppen lokalisierte Strukturgene (*tryp-1* - *tryp-4*) codiert, bei *E. coli* durch 5 funktionell und räumlich hintereinandergeschaltete (*trp E* - *trp A*). Für die Untersuchungen wurde die *Neurospora*-Mutante *tryp-1* (Kopplungsgruppe III) verwendet. Das Genprodukt des *tryp-1* Locus ist Komponente eines Multienzymkomplexes, der die Reaktionsschritte I (Anthranilatsynthetase), III (N-5-Phosphoribosyl-Anthranilatisomerase) und IV (Indol-3-Glycerolphosphat-Synthetase) katalysiert (Hütter und De Moss, 1967, Ahmad et al., 1964, Gaertner und De Moss, 1969, Arroyo-Begovich und De Moss, 1973). Für diese Syntheseschritte sind bei *E. coli* die Produkte der Gene *E*, *D* (I) und *C* (III, IV) nötig. Die applizierte Fremdinformation enthielt das gesamte *trp*-Operon von *E. coli* (Shimada et al., 1972). Um eine Heilung des Gendefektes von *Neurospora* zu erreichen, sollten davon zumindest die Gene *E*, *D* und *C* exprimiert werden. Als Kriterium dafür galt das Auftreten von tryptophanprototrophen Zellen, die

durch Plattierung auf Selektivmedium ermittelt werden.

Im dritten Hauptteil sollten schließlich die erhaltenen tryptophanprototrophen Isolate durch genetische Analysen genauer charakterisiert werden. Mendelsche 4:4 Aufspaltung der Ascosporen nach Kreuzen der prototrophen Isolate mit den auxotrophen Ausgangsstämmen würde auf eine Integration des prototrophiebedingenden Markers in das Neurosporagenom hinweisen. Über den Ort der Integration sollten weitere Kreuzungen mit dem Wildtyp Aufschluß geben. Ferner könnte eine extrachromosomale Vererbung des prototrophiebedingenden Markers durch reziproke Kreuzungen mit der *tryp-1* Mutante erkannt werden.

## B. MATERIAL und METHODEN.

### 1. Stämme.

#### 1.1. *Neurospora crassa*: Wildtyp 74-OR 23-1A de Serres;

Herkunft: Dr. Mary E. Case, Yale University.

Wildtyp 74-OR 8-1a;

auxotrophe Mutanten:

tryp-1, 10575, A, FGSC 1066;

his-1, Y155M302, A, FGSC 681;

his-5, Y152M108, A, FGSC 456;

Herkunft: Fungal Genetics Stock Center; Arcata, California 95521, U.S.A.

ad-4, F10, a, FGSC 445;

Herkunft: Genetisches Institut München, reisoliert von Frau B. Beetz

aus der Kreuzung ad-4, F10, A, FGSC 445

mit der edeinresistenten Mutante

ed<sup>r</sup>-29, a (Isolat 13).

#### 1.2. *Escherichia coli*: C 600, $\lambda^S$ , sup E<sup>+</sup>;

Herkunft: K. Krell, Department of Health, Education and Welfare, Rockville, Maryland 20852, U.S.A.

KS 110, W3623 (gal<sup>-</sup>, trp<sup>-</sup>, str<sup>r</sup>);

KS 805 (trp R<sup>-</sup>, trp A9761, trp E9828);

Herkunft: K. Shimada, Department of Biochemistry, Kyushu University, School of Medicine, Higashi-hu, Fukuoka 812, Japan.

SB 2331 (pro<sup>-</sup>, B<sub>1</sub><sup>-</sup>), lysogen für  $\phi$ 80- $\lambda$ -Hybridphagen und  $\phi$ 80- $\lambda$ dhis-Hybridphagen ( $\lambda$  c<sub>I</sub>857);

SB 1490 (his<sup>-</sup>), lysogen für  $\phi$ 80;

Herkunft: Janice Yang Chou, Laboratories of Molecular Biology, N.I.H., Bethesda, Maryland 20014, U.S.A.

KMBL 241, rec<sup>-</sup>A 36 (threo<sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>,  
his<sup>-</sup>, arg<sup>-</sup>, met<sup>-</sup>, thym<sup>-</sup>, B<sub>1</sub><sup>-</sup>);  
Herkunft: R. Thomas, Freie Uni-  
versität Brüssel, Belgien.

### 1.3. Bacteriophagen: $\lambda$ -Wildtyp;

Herkunft: K. Krell (siehe S.5).

Transduzierende Phagen:

$\lambda$ ptrp, plaquebildend, enthält  
trp-Operon von E.coli;

Herkunft: K. Shimada (siehe S.5).

$\lambda$ plac, plaquebildend, enthält  
lac-Operon von E.coli;

Herkunft: P. Gresshoff, Department of  
Genetics, Research School of Biological  
Sciences, Australian National Universi-  
ty, Canberra, A.C.T. Australia.

$\phi$ 80- $\lambda$ dhis, nicht plaquebildender  
Hybrid-Phage, enthält his-Operon von  
Salmonella, Prophage in E.coli SB  
2331, bedarf zur Lyse eines plaquebil-  
denden Helferphagens.

Herkunft: R. Martin, Laboratories of  
Molecular Biology, N.I.H., Bethesda,  
Maryland 20014, U.S.A.

## 2. Nährböden.

### 2.1. Neurospora crassa.

#### 2.1.1. Vogels Minimalmedium (50 fach):

In 750ml H<sub>2</sub>O werden gelöst: 150g Na<sub>3</sub>-Citrat $\cdot$ 5,5 H<sub>2</sub>O, 250g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 10g MgSO<sub>4</sub> $\cdot$ 7H<sub>2</sub>O, 5g CaCl<sub>2</sub> $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O, Spu-  
renelemente und Biotin (nach Vogel, 1956).

#### 2.1.2. Fries Minimalmedium (4 fach):

In 1l H<sub>2</sub>O werden gelöst: 20g NH<sub>4</sub>-Tartrat, 4g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 4g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g MgSO<sub>4</sub> $\cdot$ 7H<sub>2</sub>O, 0,4g NaCl, 0,56g CaCl<sub>2</sub> $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O,

Spurenelemente und Biotin (nach Beadle und Tatum, 1941).

#### 2.1.3. Westergaard Kreuzungsmedium:

In 1l H<sub>2</sub>O werden gelöst: 1g KNO<sub>3</sub>, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1g NaCl, 0,1g CaCl<sub>2</sub>, Spurenelemente und Biotin, 10g Glucose und bei festem Medium 15g Difco-Bacto-Agar (nach Westergaard und Mitchell, 1947).

#### 2.1.4. Glycerol complete Medium:

980ml H<sub>2</sub>O, 20ml Vogels Minimalmedium (vgl. 2.1.1.), 10ml Glycerin, 10ml Vitaminlösung, 2,5g Yeast Extract, 1g Caseinhydrolysat (pankreatisch), 15g Difco-Bacto-Agar (nach Horowitz, 1947).

#### 2.1.5. Neurospora-Culture-Medium:

1l H<sub>2</sub>O, 65g Difco-Bacto-Neurospora-Culture-Agar.

#### 2.1.6. GFS-Minimalmedium:

980ml H<sub>2</sub>O, 20ml Vogels Minimalmedium (vgl. 2.1.1.), 10g Sorbose, 0,5g Fructose, 0,5g Glucose, 15g Difco-Bacto-Agar.

#### 2.1.7. Sucroseminimalmedium:

980ml H<sub>2</sub>O, 20ml Vogels Minimalmedium (vgl. 2.1.1.), 15g Sucrose, bei festem Medium 15g Difco-Bacto-Agar.

Im Bedarfsfall Zugabe von 10<sup>-2</sup>M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Inkubation mit Phagen) oder 100 µ DEAE-Dextran/ml, 50 µ TMP/ml und 10<sup>-4</sup>M EDTA (Inkubation mit Phagen-DNS).

### 2.2. Bakterien.

#### 2.2.1. Trypton Broth (TB):

In 100ml H<sub>2</sub>O werden gelöst: 1g Trypton, 0,5g NaCl.

### 2.2.2. Trypton soft Agar:

Wie 2.2.1., Zugabe von 0,55g Difco-Bacto-Agar.

### 2.2.3. TB-Platten:

Wie 2.2.1., Zugabe von 1,1g Difco-Bacto-Agar und Thiamin·HCl, Endkonz.  $5 \times 10^{-5}\%$ .

### 2.2.4. TBMM für Übernachtskulturen (ÜK):

Wie 2.2.1., Zugabe von  $10^{-2}\text{M}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2% Maltose und  $5 \times 10^{-5}\%$  Thiamin·HCl.

### 2.2.5. TBMM für Exponentialkulturen (EK):

Wie 2.2.4.,  $10^{-3}\text{M}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

### 2.2.6. Rich plates:

Wie 2.2.3., Zugabe von  $10^{-2}\text{M}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

### 2.2.7. M9 enriched:

In 1l  $\text{H}_2\text{O}$  werden gelöst: 7g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5g NaCl, 1g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,26g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10g Cas - amino acids, 4g Glucose und  $5 \times 10^{-5}\%$  Thiamin·HCl.

### 2.2.8. Luria Broth:

In 1l  $\text{H}_2\text{O}$  werden gelöst: 10g Trypton, 5g Yeast Extract, 0,5g NaCl, 2ml 1M NaOH, einstellen von pH 7,0 mit 1n NaOH, Zugabe von 0,2% Glucose und  $5 \times 10^{-5}\%$  Thiamin·HCl.

### 2.2.9. M56 (2x):

In 1l  $\text{H}_2\text{O}$  werden gelöst: 16,4g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,4g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  anhydrid, 2g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2ml 10%ige  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -Lösung, 1ml 1%ige  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung und 1ml 0,05%ige  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -Lösung.

### 2.2.10.Minimalmedium:

400ml H<sub>2</sub>O, 400ml M56 (2x), 0,4% Glucose, 5 x 10<sup>-5</sup>%  
Thiamin·HCl, 2,5 x 10<sup>-3</sup>% TTC, 8,8g Difco-Bacto-Agar.

### 2.2.11.Wasser-Agar:

100ml H<sub>2</sub>O, 0,6% Difco-Bacto-Agar.

### 2.3.Supplementierung:

Die Nährmedien wurden im Bedarfsfall mit 100γ Adenin, Leucin, Histidin oder Prolin/ml bzw. 50γ Tryptophan/ml supplementiert.

### 3.Puffer und Lösungen:

#### 3.1.Tris·HCl-Puffer:

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (=Tris) 1M, 0,25M, 0,1M, 0,01M und 0,05M, pH 8,0; 0,05M, pH 7,4; 0,1M pH 7,2; einstellen des pH mit 1n HCl.

#### 3.2.TE-Puffer:

0,01M Tris·HCl-Puffer, pH 8,0 , 0,001M EDTA, 2M NaCl.

#### 3.3.Tris-EDTA-Puffer:

0,1M Tris·HCl, pH 7,2 , 0,001M EDTA.

#### 3.4.Dialysepuffer für "Hershey circles":

0,01M Tris·HCl-Puffer, pH 8,0 , 0,001M EDTA, 0,002M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

#### 3.5.TMG-Puffer:

In 1l H<sub>2</sub>O werden gelöst: 6g Tris, 2,5g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1g Gelatine, einstellen von pH 7,2 mit 1n HCl.

### 3.6. TM-Puffer:

In 1l H<sub>2</sub>O werden gelöst: 6g Tris, 2,5g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,  
einstellen von pH 7,2 mit 1n HCl.

### 3.7. Standard-Saline-Citrat-Puffer (SSC):

0,15M NaCl, 0,015M Na-Citrat, einstellen von pH 7,0  
mit 1n NaOH.

### 3.8. Sorbitol-Puffer:

1,3M Sorbitol, 0,02M Tris, 0,02M Maleat, 0,002M EDTA,  
einstellen von pH 5,7 mit 1n NaOH bzw. 1n HCl.

### 3.9. Acetat-Puffer:

0,05M Na-Acetat, einstellen von pH 5,6 mit 1n Essig-  
säure.

### 3.10. Saline:

0,95g NaCl in 99ml H<sub>2</sub>O lösen.

### 3.11. Lösungen für Kern.Plasma-Trennung:

Lsg. 1: 0,5M Sucrose, 0,05M Tris, 0,001M EDTA;

Lsg. 2: 0,5M Sucrose, 0,02M EDTA;

Lsg. 3: 0,5M Sucrose, 0,01M CaCl<sub>2</sub>;

Lsg. 4: 1,5M Sucrose, 0,1M CaCl<sub>2</sub>; (nach Munkres et al.,  
1966).

### 3.12. Lösungen zur Proteinkonzentrationsbestimmung:

Lsg. 1: 20g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,5g Na-Tartrat, 100ml 1n NaOH;

Lsg. 2: 1g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  zu 1l  $\text{H}_2\text{O}$ ;

Lsg. 3: 1 Volumen Folin-Reagens, 2 Volumen  $\text{H}_2\text{O}$ ;

Lsg. 4: 9 Volumen Lsg.1, 1 Volumen Lsg.2;

(nach Lowry et al.,1951).

### 3.13. Lösungen für neutrale Sucrose-Gradienten:

a) 2ml 1M Tris·HCl-Puffer, pH 8 (vgl. 3.1.), 2ml 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,5 (eingestellt mit 1n NaOH), 0,33ml Sarcosyl NL 30, 5g bzw. 20g Sucrose, mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100ml auffüllen (nach Botstein,1968);

b) 10mM Tris·HCl-Puffer, pH 8 (vgl. 3.1.), 1mM EDTA, 100mM NaCl, 5% bzw. 20% Sucrose.

### 3.14. Lösung für alkalische Sucrose-Gradienten:

1M NaCl, 1mM EDTA, 5% bzw. 20% Sucrose, einstellen von pH 12,3 mit 1n NaOH (nach Gellert,1971 ).

### 3.15. Lytic mix zur Gewinnung circulärer $\lambda$ DNS in vivo:

5ml 1M Tris·HCl-Puffer, pH 8 (vgl. 3.1.), 5ml 1M EDTA-Lösung, pH 8 (eingestellt mit 1n NaOH), 10ml 20%iges SDS, gelöst in 0,01M Tris·HCl-Puffer, pH 8 (vgl. 3.1.), 80ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.16. Detergens mix zur Gewinnung von Neurospora crassa DNS:

0,01M Tris·HCl-Puffer, pH 8 (vgl. 3.1.), 2% Sarcosyl NL 30, 3% Na- Deoxycholat, 5% SDS, gelöst in 0,02M EDTA-Lösung.

#### 4.Scintillationsflüssigkeit:

5g PPO, 0,3g POPOP, gelöst in 1l Toluol;  
für wässrige Lösungen wurde ein Gemisch aus 7,5ml Toluol-Scintillator und 3,5ml Triton X100 verwendet.

#### &.Besondere Chemikalien:

DNase aus Rinderpankreas, RNase A, Ethidiumbromid, Lysozym, Desoxyadenosin·H<sub>2</sub>O, Polyäthylenglycol (=PEG) Typ 6000, Cysteamin·HCl, Thiamin·HCl, Thymidin-5-Phosphat-Dinatrium-Salz (=TMP), Dodecylsulfat-Na-Salz (=SDS), Triphenyl - Tetrazoliumchlorid (=TTC), Triton X100 von Serva, Heidelberg.

ß-Glucuronidase/Arylsulfatase, Pronase, Folin-Reagens von Boehringer, Mannheim.

Serum-Albumin vom Rind (BSA) von Behring-Werke AG, Marburg/Lahn.

Sarcosyl NL 30 von Ciba Geigy, Basel, Schweiz

DEAE-Dextran von Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden.

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Yeast Extract, Neurospora culture Agar, Bacto Adjuvant complete Freund von Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

#### 6.Radioaktive Substanzen:

(2-<sup>14</sup>C)-Thymin, 50µCi/ml, spez.Aktivität: 60mCi/mmol;  
(methyl-<sup>3</sup>H)-Thymidin, 1mCi/ml, spez.Aktivität: 56Ci/mmol;  
(U-<sup>14</sup>C)-Uridin, 50µCi/ml, spez.Aktivität: 524mCi/mmol;  
(5,6-<sup>3</sup>H)-Uridin, 1mCi/ml, spez.Aktivität: 40Ci/mmol.

7.Glasfaserfilter, Durchmesser 21 mm, von Schleicher und Schüll, München; Dialyseschläuche von Union Carbide Corporation, Chicago, Illinois, U.S.A.

#### 8. Anzuchtverfahren zur Gewinnung von Konidien:

Erlenmeyer-Weithalskolben (300ml, Schaumstoffkappenverschluß) mit je 50ml Glycerol complete Medium (vgl. 2.1.4.) wurden mit Konidien inoculiert und 7 Tage bei 25°C bebrütet (Standardkulturen).

#### 9. Herstellung von Konidiensuspensionen:

Konidien 7 Tage alter Standardkulturen wurden als Staub trocken geerntet, in  $H_2O$  suspendiert und zur Entfernung von Mycelfragmenten durch sterile Watte filtriert. Die Bestimmung der Konidiendichte erfolgte im Coulter Counter.

#### 10. Plattierung von Konidien:

Konidien geeigneter Konzentration wurden in 100ml geschmolzenes GFS-Minimalmedium (vgl. 2.1.6.) gegeben, dieses gut durchmischt und auf 5 Petrischalen verteilt. Nach 3tägiger Bebrütung bei 25°C wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien ausgezählt.

#### 11. Ankeimung von Konidien:

$4 \times 10^6$  Konidien/ml wurden in 1 x Fries Minimalmedium (vgl. 2.1.2.) plus 2% Glucose suspendiert und 20-24 Std. bei 25°C belüftet.

#### 12. Kreuzungen:

Die Kreuzungen wurden in Petrischalen oder in Röhrchen mit Westergaard Medium (vgl. 2.1.3.), welches im Bedarfsfall supplementiert war, angesetzt und bis zum Reifen der Perithezien bei 25°C im Dunkeln bebrütet.

#### 13. Plattierung der Sporen:

Aus den Kreuzungen (vgl. 12.) wurden reife Perithezien entnommen, in  $H_2O$  suspendiert und mit einem Glasstab

aufgequetscht. Der Überstand der Ascosporensuspension wurde dekantiert, 0,1ml davon in kleinen Tropfen auf einen Objektträger pipettiert und die Anzahl der Ascosporen mikroskopisch bestimmt (Schätzwert). Zur Anreicherung der Ascosporenkeimung und zur Abtötung etwaiger Konidien wurde die Sporensuspension anschließend 60 min. bei 60°C im Wasserbad gehalten. Geeignete Mengen Ascosporen wurden in Kolben mit 100ml GFS-Minimalmedium (vgl. 2.1.6.) pipettiert und plattiert. Nach 3tägiger Bebrütung bei 25°C wurden die Kolonien ausgezählt bzw. auf Neurospora-Culture-Agar-Röhrchen (vgl. 2.1.5.) abisoliert und bei 25°C weitergezüchtet.

#### 14. Isolation von Einzelsporen:

In Petrischalen wurde 4%iger Wasseragar gegossen. Nach dem Erstarren wurde mit einer sterilen Lanzettadel ein Agarblock ausgeschnitten und auf einen Objektträger gebracht. Mit einer abgeflamnten Rasieklinge wurde ein Teil des Agarblocks in kleine Quader unterteilt, und zur Abtötung etwaiger Konidien mit 0,2ml Na-Hypochlorid-Lösung bestrichen. Nachdem die Lösung eingetrocknet war wurde ein reifes Perithecium auf das nicht unterteilte Stück des Agarblocks gegeben und mit einer sterilen Pinzette geöffnet. Auf jedes der angeritzten Quadrate wurde eine reife Spore gebracht. Die mit einer Spore versehenen Agarquader wurden einzeln in Wassermannröhrchen mit Neurospora-Culture-Agar (vgl. 2.1.5.) gegeben und im Brutraum bei 25°C aufbewahrt. Nur solche Röhrchen, in denen sich nach 14 Tagen kein Mycelwachstum zeigte, wurden weiter verwendet. Sie wurden zur Förderung der Keimungsbereitschaft 60 min. bei 60°C im Wasserbad geschockt und danach weiter bei 25°C bebrütet.

## 15. Herstellung von Doppelmutanten:

### 15.1. Kreuzung zweier Mangelmutanten:

Petrischalen mit supplementiertem Westergaard Medium (vgl. 2.1.3.) wurden gleichzeitig mit Konidienstaub beider Kreuzungspartner inoculiert. Folgende Kreuzungen wurden durchgeführt:

- a) tryp-1 A x his-1 a;
- b) tryp-1 A x his-5 a;
- c) tryp-1 A x ad-4 a.

### 15.2. Plattierung der Sporen:

Sie erfolgte gemäß 13. auf supplementiertem GFS-Minimalmedium. Von jeder Platte wurden 20 Kolonien auf Neurospora-culture-Medium -Röhrchen abisoliert und bei 25°C weitergezüchtet.

### 15.3. Auxotrophietest:

Konidienstaub der abisolierten Kolonien wurde in Röhrchen mit flüssigem Sucrose-Minimalmedium (vgl. 2.1.7.) abgeimpft. Die Röhrchen waren a) mit Tryptophan, b) mit Histidin bzw. Adenin und c) mit Tryptophan + Histidin bzw. Adenin supplementiert. Doppelmutanten wuchsen nur auf c).

### 15.4. Bestimmung des Paarungstyps:

Sie erfolgte durch Kreuzung der gemäß 15.3. als Doppelmutanten identifizierten Stämme mit Wildtyp A und a.

### 15.5. Heterokaryontest:

Doppelmutanten vom gleichen Paarungstyp wurden in der Kombination tryp-1, his-1A / tryp-1, his-5A auf Sucrose-Minimalmedium + Tryptophan bzw. tryp-1, his-1A / ad-4, his-1A auf Sucrose-Minimalmedium + Histidin geimpft. Wachstum zeigte Heterokaryonbildung zwischen den betreffenden Stämmen an.

## 16. Herstellung von Bakteriensuspensionen:

### 16.1. Gewinnung von Bakterieneinzelkolonien:

Mit einer sterilen Impfüse wurden aus einem Stammröhrchen Bakterien entnommen, in Saline verdünnt (vgl. 3.13.) und auf eine TB-Platte (vgl. 2.2.3.) ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 34°C bebrütet.

### 16.2. Herstellung einer Bakterienübernachtkultur (ÜK):

Geeignet supplementiertes M 9 enriched (vgl. 2.2.7.), Luria Broth (vgl. 2.2.8.) bzw. TBMM-ÜK-Medium (vgl. 2.2.4.) wurde mit einer Bakterieneinzelkolonie beimpft und über Nacht bei 34°C belüftet (Bakterienendkonz. ca.  $2 \times 10^9$ /ml).

### 16.3. Aufbewahrung einer ÜK:

Die nach 16.2. erstellte ÜK wurde 10 min. bei 9000 rpm im SS34 Rotor abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 0,01M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -Lösung suspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

## 17. Gewinnung von Phagenlysaten:

### 17.1. Gewinnung von $\phi 80-\lambda$ Hybridphagen:

Eine nach 16.2. erstellte ÜK des Bakterienstammes SB 2331 wurde 1:100 in TBMM-EK-Medium (vgl. 2.2.5.), supplementiert mit Prolin, verdünnt und unter Schütteln (150 rpm) bei 34°C bis zu einer Konzentration von  $3 \times 10^8$  Zellen/ml kultiviert. Nach Erreichen dieser Konzentration ( $E_{650} = 0,5$  im Beckman Photospektrometer) wurde die Bakteriensuspension in ein Wasserbad von 41°C übergeführt (Prophageninduktion) dort 45 min. bei 250 rpm geschüttelt, weitere 45 min. bei 34°C nachbebrütet und anschließend 10 min. bei 9000 rpm, 2°C, im SS34 Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand (=Phagenrohlysat, Gemisch aus his-Phagen und Helferphagen) wurde mit  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  bis zu einer Endkonzentration von 0,01M versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

## 17.2. Gewinnung von $\lambda$ ptrp-Phagen:

### 17.2.1. Plattenvermehrung:

0,1ml Bakteriensuspension (vgl. 16.3.) des Stammes C 600 wurden mit 0,1ml  $\lambda$ ptrp-Phagen (Konz. ca.  $3 \times 10^5$ /ml) vermischt, 10 min. bei  $34^\circ\text{C}$  inkubiert (Phagenadsorption) und mit 2,5ml soft Agar (vgl. 2.2.2.) und 3ml Trypton Broth (vgl. 2.2.1.) auf rich plates (vgl. 2.2.6.) ausgegossen. Die Platten wurden über Nacht bei  $41^\circ\text{C}$  bebrütet, der Plattenüberstand geerntet und  $2 \times 15$  min. bei 9000rpm,  $2^\circ\text{C}$ , im SS34 Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand mit  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Endkonz. 0,01 M) versetzt und bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 17.2.2. Flüssigvermehrung:

#### 17.2.2.1. Unmarkierte $\lambda$ ptrp-Phagen:

Eine nach 16.2. erstellte ÜK des Bakterienstammes C 600 wurde 1:100 in M 9 enriched (vgl. 2.2.7.), supplementiert mit Leucin, verdünnt und unter Schütteln (150rpm) bei  $34^\circ\text{C}$  bis zu einer Zellkonzentration von  $3 \times 10^8$ /ml angezüchtet. Die Bakterien wurden 10 min. bei 5000rpm im SS34 Rotor abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet im gleichen Volumen TM-Puffer (vgl. 3.6.) resuspendiert und nochmals 10 min. bei 5000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit  $\lambda$ ptrp-Phagen (Multiplizität 4) und  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Endkonz. 0,01 M) versetzt und 10 min. bei  $34^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde M 9 enriched (vorgewärmt auf  $41^\circ\text{C}$ ) zugegeben und die Suspension 2 Std. bei  $41^\circ\text{C}$ , 250rpm, geschüttelt. Die Bakterienzellfragmente wurden bei 9000rpm,  $2^\circ\text{C}$ , 10 min., im SS34 Rotor abzentrifugiert, der Überstand (Phagenrohlysat) mit  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Endkonz. 0,01 M) versetzt und bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### 17.2.2.2. $^3\text{H}$ -markierte $\lambda$ ptrp-Phagen:

Wie 17.2.2.1. Das vorgewärmte M 9 enriched wurde außer mit Leucin noch mit  $^3\text{H}$ -Thyminidin, Endkonz.  $2 \mu\text{Ci/ml}$  bzw.

$^{14}\text{C}$ -Thymin, Endkonz.  $0,1 \mu\text{Ci/ml}$  (vgl. 6.) und  $250 \mu\text{g}$  Desoxyadenosin/ml (nach Kammen, 1967) versetzt.

#### 18. Anreicherung und Reinigung der Phagen:

100 ml Phagenrohlysat wurden mit 10 g PEG verrührt und 30 min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,8 ml 5 M NaCl-Lösung zugegeben und weitere 30 min. inkubiert. Das Gemisch wurde 15 min. bei 11000 rpm,  $2^\circ\text{C}$ , im SS34 Rotor zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet (an PEG adsorbierte Phagen) in 10 ml TMG-Puffer (vgl. 3.5.) gelöst und auf einen CsCl-Stufengradienten geschichtet. Der CsCl-Stufengradient wurde folgendermaßen hergestellt: In ein 30 ml Cellulosenitrat-Röhrchen wurden 6 ml CsCl-Lösung,  $\rho = 1,6 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , pipettiert und mit 12 ml CsCl-Lösung  $\rho = 1,4 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , überschichtet. Die Dichten wurden im Refraktrometer bestimmt (nach Vinograd, 1963). Auf den Stufengradienten wurden die 10 ml Phagenlysat aufgebracht und der Gradient 90 min. bei 23000 rpm,  $8^\circ\text{C}$ , im SW25 Rotor zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation befinden sich die Phagen auf Grund ihrer Dichte von  $1,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  an der Grenzschicht zwischen den beiden CsCl-Lösungen. Der Boden des Röhrchens wurde mit einer Kanüle durchbohrt, diese bis zur Phagenbande vorgeschoben und die Phagen abgezapft. Zur Entfernung von CsCl wurde über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gegen 1 l TMG-Puffer (vgl. 3.5.) dialysiert.

#### 19. Titration der Phagen:

Phagenlysat wurde schrittweise in TMG-Puffer (vgl. 3.5.) verdünnt. Von den in Frage kommenden Verdünnungen wurden 0,1 ml mit 0,1 ml Bakteriensuspension (N 99 für  $\phi 80$ - $\lambda$ dhis/Helferphagengemisch, C 600 für  $\lambda$ ptrp-Phagen) vermischt, 10 min. bei  $34^\circ\text{C}$  inkubiert (Phagenadsorption) und mit 2,5 ml soft Agar (vgl. 2.2.2.) auf TB-Platten (vgl. 2.2.3.) ausgegossen. Die Platten wurden über Nacht bei  $41^\circ\text{C}$  bebrütet.

## 20. Transduktionstest:

### 20.1. Qualitativ:

0,1ml Bakteriensuspension (SB 3231 für  $\phi$ 80- $\lambda$ dhis/Helferphagengemisch, KS 110 bzw. KS 805 für  $\lambda$ ptrp-Phagen) wurden mit 2,5ml Wasser-Agar (vgl. 2.2.11.) auf eine Minimalplatte (vgl. 2.2.10.) ausgegossen. Nach Erstarren der Wasser-Agar-Schicht wurden unverdünntes Phagenlysate, sowie verschiedenen Verdünnungen davon, auf die Platte ausgetropft und diese 2-3 Tage bei 34°C bebrütet.

### 20.2. Quantitativ:

Vgl. 19. An Stelle von soft Agar wurde Wasser-Agar, an Stelle von TB-Platten Minimalplatten verwendet. Als Bakterienempfängerstämme dienten die unter 20.1. erwähnten. Die Platten wurden 2-3 Tage bei 34°C bebrütet. Um Revertanten zu erkennen wurden Kontrollplattierungen mit TMG-Puffer an Stelle von Phagenlysate durchgeführt.

### 20.3. Ermittlung der Transduktionsrate:

Die Transduktionsrate wurde durch Dividieren der nach 19. ermittelten Werte mit den entsprechenden nach 20.2. ermittelten errechnet.

## 21. Gewinnung von $\lambda$ ptrp-DNS:

Frisch destilliertes, flüssiges Phenol wurde im Verhältnis 1:2 (v:v) mit Tris-HCl-Puffer, pH 7,2, 0,1M (vgl. 3.1.), vermischt, 5 min. bei 5000rpm, 20°C, im SS34 Rotor zentrifugiert (Phasentrennung). Die obere Phase wurde verworfen, die untere (puffergesättigtes Phenol) 1:1 (v:v) mit CsCl-gereinigtem Phagenlysate versetzt und 20min. in einem Schraubröhrchen langsam gerollt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch kurzzeitig in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere Phase, welche die DNS enthält, wurde vorsichtig abpipettiert, nochmals mit dem gleichen Volumen puffergesättigtem Phenol vermischt, 20min. gerollt und zentrifugiert.

Die obere Phase wurde danach in einen Dialyseschlauch gefüllt und zur Entfernung von Phenol 3 x 12Std. bei 4°C gegen jeweils 1l SSC-Puffer (vgl.3.7.)dialysiert.

## 22.Herstellung von geschlossener 2-Ring-DNS:

Wie 17.2.2.1. und 17.2.2.2.Zur Herstellung von  $^3\text{H}$ -markierter Ring-DNS wurde als Empfängerstamm an Stelle von E.coli C 600 der Stamm KMBL 241 verwendet und nach Phagenzugabe bei 34°C an Stelle von 41°C inkubiert.Die mit Phagen infizierten Bakterien wurden nach 30min. statt nach 2Std. bei 5000rpm,2°C,20min. im SS34 Rotor abzentrifugiert,der Überstand verworfen und das Pellet auf Eis gestellt.Pro 30ml ursprünglicher Bakteriensuspension wurde 1ml kalte 25%ige Sucrose-Lösung in 0,05M Tris • HCl Puffer,pH 8,0 (vgl.3.1.)zupipettiert und 10min. auf Eis gestellt.Anschließend wurden die Bakterien durch Zugabe von 0,2ml Lysozym-Lösung,Konz. 5mg/ml in 0,25M Tris • HCl-Puffer pH 8,0(vgl.3.1.),protoplastiert,mit 0,4ml 0,25M EDTA-Lösung,pH 8,0,versetzt und 10min. auf Eis gestellt.Die protoplastierten Bakterien wurden dann,zur Auflösung der Membranen,mit 1,6ml Lytic mix (vgl.3.18.)bis zum Aufklaren bei Zimmertemperatur vorsichtig geschüttelt,mit 0,8ml 5M NaCl-Lösung vermischt,über Nacht auf Eis stehen gelassen,dann 30min.bei 16500rpm,2°C,im Ti 60 Rotor abzentrifugiert.Der Überstand wurde in ein Cellulosenitrat-Röhrchen übergeführt,mit 0,25M Tris HCl-Puffer,pH8,0(vgl.3.1.) auf 5ml aufgefüllt,0,75ml einer 0,25M EDTA-Lösung,pH8,0, sowie 0,75ml Ethidiumbromid-Lösung (Konz. 8mg/ml)zugegeben und die Dichte mit festem CsCl auf 1,58 g.cm<sup>-3</sup>eingestellt.Nach 48 stündiger Zentrifugation im Ti 50 Rotor bei 38000rpm,15°C,wurde der Boden des Röhrchens mit einer Kanüle angestochen und der Gradient gemäß 31a ausgetropft und ausgewertet oder die untere der beiden im UV sichtbaren Banden (Ring-DNS)in ein Wassermannröhrchen abgezapft.Zur Entfernung von Ethidiumbromid wurde die DNS -

Lösung 2 x mit 2 Volumen iso-Propanol ausgeschüttelt (Cozzarelli, 1968), die obere Phase verworfen und die untere (DNS-haltig) über Nacht bei 4°C gegen 1l SSC-Puffer (vgl. 3.7.) dialysiert.

### 23. Herstellung von $\lambda$ ptrp<sup>-</sup>-Hershey circles:

Lineare  $\lambda$ ptrp-DNS (vgl. 21.) wurde in TE-Puffer (vgl. 3.2.) bis zu einer Endkonzentration von 5  $\mu$ g/ml verdünnt, 2 Std. im Wasserbad bei 50°C gehalten, anschließend auf 0°C abgekühlt und 3 x gegen 1l MgSO<sub>4</sub>-haltigen Tris-HCl-Puffer (vgl. 3.4.) oder 1 x gegen 1l SSC-Puffer (vgl. 3.7.) bei 4°C dialysiert (nach Gellert, 1971).

### 24. Gewinnung von <sup>3</sup>H-markierter Bakterien-DNS:

0,2ml ÜK von E. coli C 600 wurde mit 19,8ml supplementiertem M 9 enriched (vgl. 2.2.7.) versetzt. Die Bakterien wurden bis zu einer Konzentration von  $2 \times 10^8$  Zellen/ml ( $E_{650} = 0,38$ ) kultiviert. Anschließend wurde die Suspension 10 min. bei 9000 rpm im SS34 Rotor abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2ml Medium aufgenommen. 0,1ml davon wurden zu 10ml Medium + 250  $\mu$ g Desoxyadenosin/ml (Kammen, 1967) + <sup>3</sup>H-Thymidin (Endkonz. 10  $\mu$ Ci/ml) pipettiert und bei 37°C geschüttelt bis eine Zellkonzentration von  $2 \times 10^8$ /ml erreicht war. Die Suspension wurde bei 9000 rpm 10 min. im SS34 Rotor abzentrifugiert, das Pellet in 3ml Medium aufgenommen und 30 min. bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 3ml Lysozym-Lösung (Endkonz. 0,6mg/ml) zugegeben und unter häufigem Umschütteln 45 min. bei 37°C inkubiert. Es folgten 30 min. Inkubation mit Sarcosyl NL 30 (Endkonz. 2%) (g). Die nun lysierten Bakterien wurden 1:1 (v:v) mit puffergesättigtem Phenol (0,1M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0) versetzt und 20 min. bei Raumtemperatur gerollt. Zur Phasentrennung wurde kurzzeitig zentrifugiert, die obere, DNS-enthaltende Phase abpipettiert und mit RNase gelöst in 0,15M NaCl-Lösung

(Endkonz.  $50 \mu\text{g/ml}$ ), 30min. bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Inaktivierung von DNase-Spuren wurde die RNase-Lösung vor Gebrauch 10min. bei  $80^\circ\text{C}$  inkubiert. Die DNS-Lösung wurde noch einige Male mit dem gleichen Volumen puffer-gesättigtem Phenol gerollt bis die Trübung an der Trennschicht der beiden Phasen (=Proteine) verschwunden war. Dann wurde die DNS-haltige Phase in einen Dialyseschlauch gefüllt und 3 x 12Std. gegen jeweils 1l SSC-Puffer (vgl. 3.7.) bei  $4^\circ\text{C}$  dialysiert.

#### 25. Gewinnung von radioaktiv-markierter Neurospora-DNS:

Konidien der Mutante *tryp-1, his-1A* wurden in supplementiertem Fries Minimalmedium +  $^{14}\text{C}$ -Uridin (Endkonz.  $125 \mu\text{Ci/ml}$ ) bzw.  $^3\text{H}$ -Uridin (Endkonz.  $5 \mu\text{Ci/ml}$ ) angekeimt (vgl. 11.). Nach ca. 24 Std. wurde das Mycel abgenutscht und 2 x mit jeweils 100ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Pro 1g Naßgewicht wurden 2ml  $0,05\text{M}$  Tris-HCl Puffer, pH 8,0 (vgl. 3.1.) + 10mg Cysteamin-HCl zugegeben und 15min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Mycel wurde anschließend 5min. bei 7000rpm im SS34 Rotor abzentrifugiert und 1 x mit Sorbitol-Puffer (vgl. 3.8.) gewaschen. Es folgte die Protoplastierung der Zellen durch 90min. Inkubation mit  $0,2\text{ml}$  Glucuronidase +  $1,8\text{ml}$  Sorbitolpuffer bei  $25^\circ\text{C}$ . Die Protoplasten wurden anschließend 5min. bei 7000rpm,  $0^\circ\text{C}$ , im SS34 Rotor abzentrifugiert, 1 x mit eiskaltem Sorbitol-Puffer gewaschen und durch Zugabe von 2ml Detergens mix (vgl. 3.19.) + 1ml 2,5%iges Triton X 100 + 1ml  $0,25\text{M}$  EDTA-Lösung, pH 8,0 (15min. bei  $37^\circ\text{C}$ , gelegentliches Schütteln) lysiert. Nach 5min. Zentrifugation bei 7000rpm,  $0^\circ\text{C}$ , wurde der Überstand (=DNS) in einen Dialyseschlauch gefüllt und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gegen 1l SSC-Puffer (vgl. 3.7.) dialysiert.

#### 26. Bestimmung des Reinheitsgrades der DNS-Präparationen:

Die Reinheitsprüfung erfolgte im Beckman Photospektrometer mit Hilfe des Quotienten  $E_{260}/E_{280}$ .

## 27. Konzentrationsbestimmung der DNS-Präparationen:

Die Konzentration der DNS wurde im Beckman Photospektrometer durch Messen der Extinktion bei 260nm ermittelt, wobei ein Wert von 0,02 1/g DNS/ml entspricht.

## 28. Zentrifugation der DNS im neutralen CsCl-Dichte-Gradienten:

In Cellulosenitrat-Röhrchen wurden gefüllt:

- a)  $^{14}\text{C}$ -markierte Neurospora-DNS (vgl. 25.) + 1ml  $^3\text{H}$ -markierte Bakterien-DNS (vgl. 24.);
- b)  $^{14}\text{C}$ -oder  $^3\text{H}$ -markierte Neurospora-DNS (vgl. 25.) + 50-100  $^3\text{H}$ -oder  $^{14}\text{C}$ -markierte lineare  $\lambda$ ptrp-DNS (vgl. 21.);
- c)  $^{14}\text{C}$ -markierte Neurospora-DNS + DNS aus Neurosporazellen, die mit  $^3\text{H}$ -markierter  $\lambda$ ptrp-DNS inkubiert worden waren (vgl. 42.).

Im Bedarfsfall wurde mit SSC-Puffer auf 5ml aufgefüllt. Durch Zugabe von festem CsCl wurde die Dichte auf 1,71  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  eingestellt und anschließend 48 Std. bei 38000rpm, 15°C, im Ti 50 Rotor zentrifugiert.

## 29. Zentrifugation der DNS im neutralen 5-20%igen Sucrose-Gradienten:

In Cellulosenitrat-Röhrchen wurde mittels eines Gradientenmischers ein 5-20%iger Sucrose-Gradient geschichtet. Dabei wurden von der 5%igen Sucrose-Lösung 2,2ml und von der 20%igen 2,1ml verwendet. Auf die Gradienten, die aus den Sucrose-Lösungen a) (vgl. 3.15.a) geschichtet wurden, wurden 0,1ml  $^3\text{H}$   $\lambda$ ptrp-DNS und als Referenz 0,1ml  $^{14}\text{C}$ -DNS des Salmonella -Phagen P22 (präpariert von U. Kinkeldey, Genetisches Institut, München) aufgetragen, auf die Gradienten aus den Sucrose-Lösungen b) (vgl. 3.16.b) 0,1ml lineare  $^{14}\text{C}$   $\lambda$ ptrp-DNS und 0,1ml  $^3\text{H}$ -markierte "Hershey circles". Es wurde jeweils 3 Std. bei 25000rpm, 23°C, im SW 50.1 Rotor zentrifugiert.

### 30. Zentrifugation der DNS im alkalischen 5-20%igen Sucrosegradienten:

Die Schichtung der Gradienten erfolgte analog 29. unter Verwendung von Polyallomer-Röhrchen und Sucrose-Lösungen mit dem pH 12,3 (vgl. 3.17.). Auf die Gradienten wurden 0,1 ml  $^{14}\text{C}$ -markierte lineare  $\lambda$ ptrp-DNS (vgl. 21.) und 0,1 ml  $^3\text{H}$ -markierte geschlossene  $\lambda$ -Ring-DNS (vgl. 22.) aufgetragen. Die Zentrifugationen wurden 70 min. bei 38000 rpm,  $5^{\circ}\text{C}$ , im SW 50.1 Rotor durchgeführt.

### 31. Auswertung der Gradienten:

Nach beendeter Zentrifugation wurden die Röhrchen am Boden mit einer Kanüle angestochen.

a) Die Gradienten 28a, b. und c wurden in Fraktionen von jeweils 5 Tropfen in Wassermannröhrchen ausgetropft und zur Hydrolyse von RNS über Nacht mit dem gleichen Volumen 1n NaOH bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200  $\gamma$  BSA/ml zugegeben und zur Fällung der DNS 30 min. im Eisbad mit dem gleichen Volumen 20%iger TCA inkubiert. Der Inhalt der Röhrchen wurde auf Glasfaserfilter abgenutscht und diese zur Entfernung von Nucleotiden mit 10 ml eiskalter TCA-Lösung und Äthanol gewaschen.

b) Die Gradienten 29. und 30. wurden in Fraktionen von jeweils 5 Tropfen auf Glasfaserfilter aufgebracht und die Filter 30 min. im Eisbad mit 10%iger TCA-Lösung (Fällung der DNS), sowie jeweils 10 min. mit 1%iger TCA-Lösung und Äthanol (Entfernung der Nucleotide) behandelt.

Die Filter wurden ca. 60 min. bei  $60^{\circ}\text{C}$  getrocknet, in Gläschen mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit (vgl. 4.) übergeführt und die Radioaktivität im Packard Liquid Scintillation Spectrometer gemessen.

### 32. Molekulargewichtsbestimmung der $\lambda$ ptrp-DNS:

Sie erfolgte durch Zentrifugation der DNS im neutralen

5-20%igen Sucrose-Gradienten(vgl.29).Nach Auswertung des Gradienten(vgl.31.b) wurden die Sedimentationsstrecken der  $^3\text{H}$ -markierten  $\lambda$ ptrp-DNS und der  $^{14}\text{C}$ -markierten Referenz-DNS festgestellt.Dies geschah durch Auszählen der Fraktionen,von der Oberfläche des Gradienten her anfangend,bis zum Maximum der Radioaktivität. Über die Beziehung

$$\frac{D_2}{D_1} = \left( \frac{M_2}{M_1} \right)^{0,35}$$

(Burgi und Hershey,1963),wurde das Molekulargewicht der  $\lambda$ ptrp-DNS ermittelt ( $M_1$  und  $M_2$  bedeuten die Molekulargewichte, $D_1$  und  $D_2$  die entsprechenden Sedimentationsdistanzen).

### 33.Dichtebestimmung der DNS:

Von jeder 2.Fraktion des CsCl-Gradienten 28.a,der in Wassermannröhrchen ausgetropft worden war(vgl.31.b), wurden die Refraktrometerwerte bestimmt.Aus diesen wurde nach der Formel :

$$\rho^{25^\circ\text{C}} = 10,8601 \times \eta_D^{25^\circ\text{C}} - 13,4974$$

(Vinograd,1963) die Dichte bestimmt ( $\rho^{25^\circ\text{C}}$  =Dichte bei  $25^\circ\text{C}$ , $\eta_D^{25^\circ\text{C}}$  =Refraktrometerwert bei  $25^\circ\text{C}$ ).

### 34.Inkubation von Neurosporazellen mit Phagen:

#### 34.1.Phagenzugabe während der Heterokaryonbildung:

a)Petrischalen mit supplementiertem Glycerol complete Medium(vgl.2.1.4.) wurden mit den Neurosporastämmen tryp-1,his-1A, tryp-1,his-5A bzw.ad-4,his-1A beimpft und ca.24Std. bei  $25^\circ\text{C}$  bebrütet.Aus den Platten wurden Würfel mit einer Seitenlänge von ca. 0,5cm ausgeschnitten. Jeweils ein Würfel mit Mycel des Stammes tryp-1,his-1A

wurde zusammen mit einem Würfel mit Mycel des Stammes tryp-1,his-5A bzw. ad-4,his-1A im Abstand von ca. 3cm mit der mycelbewachsenen Seite nach unten, in eine Petrischale gelegt. Die Petrischale enthielt flüssiges Sucrose-Minimalmedium (vgl. 2.1.7.) + Tryptophan bzw. Histidin +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Endkonz. 0,01M) +  $\lambda$ ptrp-Phagen bzw.  $\phi$ 80- $\lambda$ dhis/Helferphagen-Gemisch. Die Platten wurden 1-3 Tage bei 25°C bebrütet.

b) Wassermannröhrchen mit phagenenthaltendem Sucrose-Minimalmedium (vgl. 34.1.a) wurden mit Konidien der Stämme tryp-1,his-1A + tryp-1,his-5A beimpft und 1-3 Tage bei 25°C bebrütet.

### 34.2. Inkubation von fragmentiertem Mycel mit Phagen:

Die Stämme tryp-1,his-1A, tryp-1a bzw. Wt A wurden, wie unter 34.1.a beschrieben, auf Glycerol complete Platten angezüchtet. Aus den Platten wurden Würfel ausgeschnitten und jeweils einer, mit der mycelbewachsenen Seite nach unten, in die Mitte einer Petrischale mit flüssigem Sucrose-Minimalmedium, das im Bedarfsfall supplementiert war, gelegt. Nach 20 stündiger Bebrütung bei 25°C wurde das Mycel geerntet, abgenutscht, 2 x mit jeweils 100ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und mit einer sterilen Rasierklinge zerschnitten. Das zerschnittene Mycel wurde auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem Tropfen  $\lambda$ ptrp-Phagenlysat überschichtet und 1-3 Tage bei 25°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

### 35. Nachweis von Phagen in den Neurospora zellen:

#### 35.1. Entfernung extrazellulär gebundener Phagen durch Enzymbehandlung:

Heterokaryotisches tryp-1,his-1A/tryp-1,his5A Mycel, das, wie unter 34.1.a beschrieben, 1-2 Tage mit  $\lambda$ ptrp-Phagen angezüchtet worden war, wurde geerntet, abgenutscht und 5 x mit jeweils 100ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Das letzte Waschwasser

wurde mit E.coli C 600 titriert(vgl.19).Das Mycel wurde 2Std.mit 10%iger Glucuronidase (0,1ml Enzym + 0,9ml Sorbitol-Puffer pro Platte)behandelt und anschließend durch 5min.Zentrifugation bei 7000rpm,2°C,im SS34 Rotor pelletiert.Der Überstand( $\bar{U}_1$ ) wurde titriert,das Pellet 2 x mit je 1ml Sorbitol-Puffer gewaschen,jeweils abzentrifugiert und der Überstand ( $\bar{U}_1$  bzw. $\bar{U}_2$ )titriert.Das Pellet wurde durch Zugabe von 1ml hypotonem Medium ( $H_2O$ ) und 45 sec.Ultraschallbehandlung homogenisiert und anschließend titriert.Zur Kontrolle wurde heterokaryotisches Mycel ohne Phagen angezüchtet,10min.mit Phagen inkubiert und wie vorher beschrieben weiter behandelt.

#### 35.2.Inaktivierung extrazellulär gebundener Phagen mit Antiserum:

Heterokaryotisches tryp-1,his-1A/ad-4,his-1A Mycel wurde 1 Tag mit einem  $\phi 80-\lambda$ dhis/Helferphagen-Gemisch angezüchtet(vgl.34.1.a),geerntet,abgenutscht und 5 x mit jeweils 100ml  $H_2O$  gewaschen.Das letzte Waschwasser wurde mit E.coli N99 titriert.Das Mycel wurde anschließend mit 1ml (pro Platte)  $\phi 80-\lambda$ dhis/Helferphagen-Antiserum (vgl. 36.) 0,15,30 und 60min. bei 25°C inkubiert,3 x mit je 100 ml  $H_2O$  gewaschen (Entfernung des Antiserums) und 2Std. mit 10%iger Glucuronidase(vgl.35.1.)behandelt.Die Zellen wurden durch Zugabe von 1ml  $H_2O$  und 45sec.Ultraschallbehandlung homogenisiert und anschließend titriert. Zur Kontrolle wurde heterokaryotisches Mycel ohne Phagen angezüchtet,10min.mit Phagen inkubiert und wie vorher beschrieben weiter behandelt.

#### 36.Herstellung von Phagen-Antikörpern:

Einem Kaninchen wurde 3 x im Abstand von jeweils 14 Tagen ein  $\phi 80-\lambda$ dhis/Helferphagen-Lysat injiziert.Bei der 1.Injektion wurden  $1 \times 10^{10}$  p.f.u.(=plaque forming units) in 7ml Freund adjuvant complete subkutan verabreicht, bei der 2. und 3.Injektion  $1 \times 10^9$  bzw.  $5 \times 10^9$  p.f.u.

in physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal. 14 Tage nach der 3. Impfung wurde dem Kaninchen durch Herzpunktion Blut entnommen und auf Phagen-Antikörper hin untersucht (vgl. 37.). Da der Antikörpertiter zu diesem Zeitpunkt bereits genügend hoch war, wurde das Kaninchen einige Tage später ausgeblutet. Das Antikörper enthaltende Serum wurde durch Zentrifugation von den Erythrozyten abgetrennt, 30 min. bei  $56^{\circ}\text{C}$  erhitzt und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die Injektionen und Blutentnahmen wurden am Institut für Mikrobiologie des Fachbereichs Tiermedizin von Herrn Dr. P. Bachmann und Herrn Dr. G. Jensch durchgeführt.

### 37. Titration der Phagen-Antikörper:

Das Phagen-Antiserum (vgl. 36.) wurde in 2er Schritten bis  $1/2560$  verdünnt und mit Phagenlysate 1:1 (v:v) vermischt (Phagen-Endkonz. ca.  $1 \times 10^3/\text{ml}$ ). Nach 60 min. Inkubation bei  $25^{\circ}\text{C}$  wurden 0,1 ml des Antiserum/Phagen-Gemisches mit 0,1 ml E. coli N99 titriert. Außerdem wurden 0,1 ml Phagenlysate verschiedener Konzentration mit 0,1 ml unverdünntem Antiserum 60 min. bei  $25^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend mit 0,1 ml E. coli N99 titriert.

### 38. Messung der Phagen-Inaktivierung im Neurospora-Kulturmedium:

Heterokaryotisches tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Mycel wurde, wie unter 34.1.a beschrieben, in Sucrose-Minimalmedium + Tryptophan +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Endkonz. 0,01 M) ohne Phagen angezüchtet. Nach 1 Tag wurde das Kulturmedium abfiltriert und mit  $\lambda$ trp-Phagen versetzt. Der Phagentiter wurde sofort bei Inkubationsbeginn und nach 1 tägiger Inkubation bestimmt. Zur Kontrolle wurde an Stelle von Kulturmedium filtersterilisiertes Sucrose-Minimalmedium (vgl. 2.1.7.) bzw. TMG-Puffer (vgl. 3.5.) verwendet.

### 39. Messung der Phagen-Inaktivierung in den Neurospora-zellen:

Heterokaryotisches tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Mycel, das 1 Tag mit  $\lambda$ ptrp-Phagen inkubiert worden war (vgl. 34.1.a), wurde in 4 Portionen gleichen Naßgewichts geteilt. 1 Portion wurde sofort, wie unter 35.1. beschrieben, weiter behandelt. Die übrigen 3 Portionen wurden, nach 5 x Waschen mit jeweils 100ml  $H_2O$  und anschließender Titration des letzten Waschwassers, in je 50ml flüssiges Sucrose-Minimalmedium (vgl. 2.1.7.), supplementiert mit Tryptophan, übergeführt und 1,3 bzw. 5 Tage bei  $25^{\circ}C$  weitergezüchtet. Anschließend wurde gemäß 35.1. weiter verfahren.

### 40. Abbau von Phagen-DNS in Neurospora-Extrakten:

#### 40.1. Ankeimung:

Konidien des Stammes tryp-1a wurden wie unter 11. beschrieben angekeimt.

#### 40.2. Zellaufschluß:

Das Mycel wurde abgenutscht, mit Na-Acetat Puffer (vgl. 3.9.) gewaschen und das Naßgewicht bestimmt. 3g Mycel wurden mit 20ml Na-Acetat Puffer in einem Küchenmixer 1min. gemixt, 50sec. mit Glasperlen in einem Zellhomogenisator aufgeschlossen und 30min. im SS34 Rotor bei 10000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Proteingehalt des Überstandes nach Lowry et al., 1951, bestimmt (Lösungen zur Protein-Konzentrationsbestimmung vgl. 3.12.).

#### 40.3. Inkubation mit Phagen-DNS:

Das Inkubationsgemisch enthielt Proteinlösung (Protein-Endkonz. 1,4mg/ml),  $^3H$ - $\lambda$ ptrp-DNS (Endkonz. 1,7 $\mu$ /ml) und zwar die lineare Form (vgl. 21.), geschlossene Ring-DNS (vgl. 22.) bzw. "Hershey circles" (vgl. 23.),  $MnCl_2$  (Endkonz. 0,1M) sowie +/- DEAE-Dextran (Endkonz. 100 $\mu$ /ml). Die angegebenen Konzentrationen wurden durch Zugabe von Na-Acetat Puffer

eingestellt. Nach 0, 1, 3 und 6 Std. Inkubation bei 20°C wurden jeweils 2 x 0,1 ml des Inkubationsgemisches auf Glasfaserfilter aufgetropft und diese analog 31.b weiterbehandelt.

#### 41. Messung des Abbaus von Phagen-DNS in verschiedenen Neurospora-Kulturmedien:

Heterokaryotisches tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Mycel wurde, wie unter 34.1. beschrieben, in Sucrose-Minimalmedium +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Endkonz. 0,01M) + Tryptophan angezüchtet. Nach 1 Tag wurde das Kulturmedium abfiltriert und supplementiert mit:

- a) EDTA (Endkonz.  $10^{-4}\text{M}$ );
- b) EDTA (Endkonz.  $10^{-4}\text{M}$ ) + TMP (Endkonz. 100  $\mu\text{g/ml}$ );
- c) EDTA (Endkonz.  $10^{-4}\text{M}$ ) + TMP (Endkonz. 100  $\mu\text{g/ml}$ ) + DEAE-Dextran (Endkonz. 100  $\mu\text{g/ml}$ ).

0,9 ml der angegebenen Medium bzw. zur Kontrolle SSC-Puffer (vgl. 3.7.) wurden mit 0,1 ml  $^3\text{H}$ -markierter linearer  $\lambda\text{ptrp}$ -Phagen-DNS (vgl. 21.) versetzt. Nach 1 tägiger Inkubation bei 25°C wurden die Inkubationsgemische mit dem gleichen Volumen 20%iger TCA-Lösung versetzt und analog 31.a weiterbehandelt.

#### 42. Nachweis von $^3\text{H}$ -markierter $\lambda\text{ptrp}$ -DNS in den Neurosporazellen:

Heterokaryotisches tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Mycel wurde analog 34.1.a 1 Tag mit  $^3\text{H}$ -markierter  $\lambda\text{ptrp}$ -DNS inkubiert. (Zusammensetzung des Inkubationsmediums siehe 41.c). Nach Abschluß der Inkubation wurde das Mycel abgenutscht, 5 x mit je 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und 30 min. bei 37°C in 3 ml  $5 \times 10^{-3}\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ -Lösung mit 100  $\mu\text{g}$  DNase/ml behandelt (Abbau der extrazellulären DNS). Das Mycel wurde abgenutscht, 3 x mit je 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend homogenisiert (vgl. 35.1.). Das Homogenisat wurde 1:1 (v:v) mit 20%iger TCA-Lösung versetzt und analog 31.a weiterbehandelt. Zu Beginn der Inkubation wurde ferner die Radioaktivität im In-

kubationsmedium analog 31.b bestimmt.

43. Verteilung der Radioaktivität in den Neurospora-Zellen nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ - $\lambda$  ptrp-DNS:

43.1. Inkubation mit  $^3\text{H}$ - $\lambda$  ptrp-DNS:

Siehe 42.

43.2. Zellaufschluß:

Gewaschene und DNase-behandelte Neurospora-Mycelien (vgl. 42.) von 10 Inkubationsplatten wurden gesammelt, mit flüssigem Stickstoff übergossen und zu Pulver zerrieben.

43.3. Auftrennung in suzellanäre Fraktionen:

Sie erfolgte durch differentielle Zentrifugation nach Munkres et al., 1966 (Lösungen für die Kern-Plasma-Trennung siehe 3.11.).

43.4. Messung der Radioaktivität in den subzellanären Fraktionen:

Der nach 43.3. erhaltene Mikrosomenüberstand wurde in Portionen von jeweils 1ml in 10ml Triton-Toluol (vgl. 4.) gemessen. Die erhaltenen Werte wurden addiert. Die Kern- bzw. Mitochondrienfraktionen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1ml aufgefüllt und ebenfalls in Triton-Toluol gemessen.

43.5. Korrektur der Radioaktivitätswerte:

Die nach 43.4. ermittelten Werte (=A-Werte) wurden unterschiedlich gequenchet. Um sie miteinander vergleichbar zu machen war deshalb eine Korrektur nötig:

In 10ml Triton-Toluol wurden  $10\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Toluol eingebracht und die Radioaktivität bestimmt (=C-Werte). Anschließend wurden in die nach 43.4. hergestellten Proben ebenfalls jeweils  $10\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Toluol pipettiert und die Radioaktivität bestimmt (=B-Werte). Von den B-Werten wurden die entsprechenden A-Werte subtrahiert:  $B - A = B^0$ . Der C-Wert wurde durch die einzelnen  $B^0$ -Werte dividiert:  $C : B^0 = f$ . Die A-Werte

wurden nun mit dem Faktor  $f$  multipliziert:  $A \times f = A^{\circ}$ .  
Die  $A^{\circ}$ -Werte stellten die korrigierten Werte dar.

#### 44. Versuche zur Ausprägung prokaryotischer Erbinformation in den Neurosporazellen:

##### 44.1. Bestimmung der spontanen Reversionsraten:

Die spontane Reversionsrate der Stämme *tryp-1a*, *tryp-1*, *his-1* A und *tryp-1*, *his-5A* bezüglich des *tryp-1* Markers wurde ermittelt, indem jeweils  $5 \times 10^8$  Konidien, verteilt auf 10 GFS-Minimalmedium-Kolben (vgl. 2.1.6.), plattiert wurden (vgl. 8., 9. und 10.). Die Medien waren im Bedarfsfall mit Histidin supplementiert. Die Bestimmung der spontanen Reversionsrate bezüglich des *his-1* Markers bzw. des *his-5* Markers erfolgte in entsprechender Weise.

##### 44.2. Anzucht von Phagen - bzw. Phagen-DNS-inkubierten Neurosporaellen:

Heterokaryotisches *tryp-1*, *his-1A*/*tryp-1*, *his-5A* Mycel und fragmentiertes *tryp-1a* bzw. *tryp-1*, *his-1A* Mycel wurde 1-3 Tage mit  $\lambda_{ptrp}$ -Phagen bzw. deren DNS inkubiert (vgl. 34.). Zur Kontrolle wurde mit  $\lambda_{Wt}$  und  $\lambda_{plac}$ -Phagen bzw. deren DNS, sowie mit SSC-Puffer (vgl. 3.7.) und TMG-Puffer (vgl. 3.5.) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Mycel gewaschen, auf Glycerol complete Medium (vgl. 2.1.4.) übergeführt und 4 - 10 Wochen bei 25°C weitergezüchtet. Die Konidien wurden auf GFS-Minimalmedium (vgl. 2.1.6.) plattiert (vgl. 8., 9. und 10.). Pro GFS-Kolben wurden jeweils  $1 - 2 \times 10^7$  Konidien zugegeben. Nach 3tägiger Bebrütung bei 25°C wurden die Platten auf makroskopisch sichtbare *tryp*<sup>+</sup>-Kolonien untersucht und diese auf Neurospora-Culture-Agar-Röhrchen (vgl. 2.1.5.) abisoliert.

#### 44.3. Auxotrophietest:

tryp<sup>+</sup>-Isolate, die nach Inkubation von fragmentiertem tryp-1, his-1A Mycel erhalten worden waren (vgl. 44.2.), wurden analog 15.3. auf ihre Histidin-Auxotrophie hin getestet.

#### 44.4. Züchten von Subkulturen:

Von den nach 44.2. erhaltenen tryp<sup>+</sup>-Isolaten wurden durch Überimpfen auf Neurospora-culture-Agar-Röhrchen (vgl. 2.1.5.) Subkulturen angelegt. Das Überimpfen erfolgte im Abstand von 3 Tagen.

#### 44.5. Prüfung der Stabilität der tryp<sup>+</sup>-Isolate:

##### 44.5.1. Qualitativer Test:

Die nach 44.2. abisolierten Kolonien, sowie deren Subkulturen (vgl. 44.4.), wurden auf flüssiges Sucrose-Minimalmedium (vgl. 2.1.7.) +/- Tryptophan geimpft und 2-3 Tage bei 25°C bebrütet.

##### 44.5.2. Quantitativer Test:

Von 3 der nach 44.2. abisolierten tryp<sup>+</sup>-Kolonien, sowie deren Subkulturen Nr. 2, 4, 6, 8 und 10 (vgl. 44.4.) wurden Standardkulturen angezüchtet (vgl. 8.), anschließend jeweils ca. 300 Konidien auf GFS-Minimalmedium (vgl. 2.1.6.) +/- Tryptophan plattiert (vgl. 9. und 10.).

#### 44.6. Heterokaryontest:

Von den nach 44.2. abisolierten tryp<sup>+</sup>-Kolonien wurden bezüglich der tryp<sup>+</sup>-Marker quantitative Heterokaryonteste durchgeführt. Dazu wurden von den Kolonien Standardkulturen angezüchtet (vgl. 8.), anschließend jeweils ca. 300 Konidien auf GFS-Minimalmedium (vgl. 2.1.6.) +/- Tryptophan plattiert (vgl. 9. und 10.).

#### 45. Einfluß von Tryptophan im Anzuchtmedium auf die Stabilität der Tryptophan-Prototrophie:

Von 3 verschiedenen heterokaryotischen Isolaten (vgl. 44.6.) wurden auf Glycerol complete Medium +/- Tryptophan Standardkulturen angezüchtet (vgl. 8.). Anschließend wurden jeweils ca. 300 Konidien auf GFS-Minimalmedium (vgl. 2.1.6.) +/- Tryptophan plattiert (vgl. 9. und 10.).

#### 46. Genetische Analyse der $\text{tryp}^+$ -Isolate:

##### 46.1. Kreuzung der instabilen $\text{tryp}^+$ -Isolate:

6  $\text{tryp}^+$ -Isolate, die sich im qualitativen Test (vgl. 44.5.1.) als instabil erwiesen hatten, wurden mit einem  $\text{tryp}^-1$  Stamm gekreuzt (vgl. 12.). Das instabile Isolat wurde vorgeimpft. Die Plattierung der Sporen erfolgte gemäß 13. auf GFS-Minimalmedium (vgl. 2.1.6.) +/- Tryptophan.

##### 46.2. Kreuzung der homokaryotischen $\text{tryp}^+$ -Isolate:

Isolate, die sich im Heterokaryontest (vgl. 44.6.) als homokaryotisch bezüglich des  $\text{tryp}^+$ -Markers erwiesen hatten, wurden

- a) reziprok mit einem  $\text{tryp}^-1$  Stamm gekreuzt,
- b) mit dem Wildtyp gekreuzt, wobei das  $\text{tryp}^+$ -Isolat vorgeimpft wurde (weiblicher Partner).

Zur Kontrolle wurden außerdem die Kreuzungen  $\text{WtA} \times \text{WtA}$ ,  $\text{tryp}^-1, \text{his}^-1\text{A} \times \text{tryp}^-1\text{a}$ , sowie reziproke Kreuzungen des Stammes  $\text{tryp}^-1\text{a}$  mit  $\text{WtA}$  angesetzt.

Die Kreuzungen wurden wie unter 12. beschrieben durchgeführt. Die Plattierung der Sporen erfolgte nach 13. auf GFS-Minimalmedium (vgl. 2.1.6.) +/- Tryptophan bzw. +/- Histidin (=Kontrolle).

46.3. Erstellung reiner  $\text{tryp}^+$ -Stämme aus heterokaryotischen Isolaten.

Die heterokaryotischen  $\text{tryp}^+$ -Isolate (vgl. 44.6.) wurden jeweils mit einem  $\text{tryp}^-$  Stamm gekreuzt, wobei das heterokaryotische Isolat vorgeimpft wurde. Die Kreuzungen erfolgten nach 12., die nachfolgende Plattierung der Sporen auf GFS-Minimalmedium (vgl. 2.1.6.) ohne Tryptophan nach 13. Von den Platten wurden  $\text{tryp}^+$ -Kolonien abisoliert und auf Neurospora-Culture-Agar (vgl. 2.1.5.) weitergezüchtet. Aus den Kreuzungen wurden ferner Einzelsporen gemäß 14. isoliert und auf ihre Tryptophan-auxotrophie getestet (vgl. 15.3.).

46.4. Heterokaryontest der  $\text{tryp}^+$ - $F_1$ -Isolate:

Vgl. 44.6.

46.5. Kreuzung der  $\text{tryp}^+$ - $F_1$ -Isolate:

Die nach 46.3. erstellten  $\text{tryp}^+$ - $F_1$ -Isolate wurden

a) mit einem  $\text{tryp}^-$  Stamm und

b) mit dem Wildtyp gekreuzt .

Die  $\text{tryp}^+$ - $F_1$ -Isolate wurden vorgeimpft. Die Kreuzungen erfolgten gemäß 12., die Plattierung der Sporen auf GFS-Minimalmedium (vgl. 2.1.6.) +/- Tryptophan nach 13.

47. Einfluß der Phagen auf die Keimungsrate von Wildtyp-konidien:

Fragmentiertes Wt-Mycel wurde 1 Tag mit  $\lambda_{\text{ptrp}}$ -Phagen bzw. zur Kontrolle mit TMG-Puffer inkubiert (vgl. 34.2.) und anschließend auf Glycerol complete Medium (vgl. 2.1.4.) weitergezüchtet. Nach 4-6 Wochen wurden die Konidien, ca. 300/ GFS-Minimalmedium-Kolben, plattiert (vgl. 9. und 10.).

#### 48. Statistische Sicherung:

Der Standardfehler des Mittelwertes ( $\sigma$ ) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n(n-1)}}$$

$n$  = Stichprobenumfang,  $x$  = Einzelwert,  $\bar{x}$  = Mittelwert aus den Einzelwerten.

Bei  $\bar{x} \pm 2\sigma$  sind 95% aller Stichprobenerfaßt. 5% werden mehr als  $2\sigma$  vom wahren Mittelwert abweichen.

## C. ERGEBNISSE.

### 1. Behandlung von Neurosporazellen mit Phagen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob Phagenpartikel in fusionierende Neurospora-zellen eingeschleust werden können. Der Nachweis sollte durch Reisolieren der Phagen aus den Pilzzellen und anschließende Titration mit einem Bakterienindikatorstamm erfolgen (biologischer Nachweis).

Für die Untersuchungen wurden die Neurospora-Doppelmutanten tryp-1, his-1A und tryp-1, his-5A bzw. tryp-1, his-1A und ad-4, his-1A verwendet, da diese Stämme

- a) zur Heterokaryonbildung befähigt sind (vgl. B.15.5. und mikroskopische Beobachtungen) und sich
- b) zur Erkennung der Expression prokaryotischer DNS eignen (Auftreten von prototrophen Zellen nach entsprechender Behandlung mit spezifisch transduzierenden Phagen bzw. deren DNS).

#### 1.1. Messung der Inaktivierung von Phagen im Neurospora-Kulturmedium.

Durch die biologische Nachweismethode können nur aktive Phagenpartikel erfaßt werden. Intrazelluläre Phagen, die bereits im Kulturmedium oder nach ihrem Eindringen in die Neurospora-zellen inaktiviert wurden, können mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Um zu prüfen, ob im Inkubationsmedium eine Phageninaktivierung erfolgt, wurde die Konzentration von  $\lambda$ pt<sub>trp</sub>-Phagen bestimmt, die 1 Tag bei 25°C mit Neurospora-kulturmedium inkubiert worden waren. Zur Kontrolle wurde an Stelle von Kulturmedium filtersterilisiertes Sucrose-Minimalmedium (vgl. B.2.1.7.) und TMG-Puffer (vgl. B.3.5.) verwendet (vgl. B.38.). Die Phagenausgangskonzentration betrug  $7 \times 10^9$ /ml. Nach 1 tägiger Inkubation enthielt das Kulturmedium nur mehr  $2,4 \times 10^9$ , das Sucrose-

Minimalmedium  $2,2 \times 10^9$  und der TMG-Puffer  $2,1 \times 10^9$  plaquebildende Partikel pro ml. Die Phageninaktivierung betrug somit ca. 70%. Die Ergebnisse besagen, daß die Inaktivierung nicht auf die Wirkung von extrazellulären Proteasen (Matile, 1964, 1965, 1967) zurückzuführen ist und daß ferner auch die Zusammensetzung des Inkubationsmediums nicht dafür verantwortlich sein kann. Sie scheint vielmehr durch die Inkubationstemperatur von  $25^\circ\text{C}$  bedingt zu sein.

## 1.2. Nachweis von Phagen in den Neurosporangzellen.

Der Nachweis sollte, wie bereits erwähnt, durch Reisolierung der Phagen aus inkubiertem, heterokaryotischem Neurospora Mycel und anschließende Titration mit einem Bakterienempfängerstamm erfolgen. Dazu war es wichtig zunächst alle nicht mit Neurospora assoziierten Phagen quantitativ zu entfernen. Dies geschah durch wiederholtes Waschen der Mycelien mit jeweils 100ml  $\text{H}_2\text{O}$  (vgl. B. 35.1. und 35.2.). Durch Titration der Waschflüssigkeiten konnte gezeigt werden, daß 5 maliges Waschen mit jeweils 100ml ausreicht, um  $5 \times 10^9$  aktive, in 5ml Inkubationsmedium enthaltene Phagen nahezu vollständig zu entfernen (ca. 60-100 p.f.u./100ml Waschflüssigkeit).

Um sicher zu sein, daß die nach Aufschluß der gewaschenen Neurosporangzellen gefundenen plaque-bildenden Partikel tatsächlich aus dem Zellinneren stammen und nicht lediglich an die Zelloberfläche gebunden waren, wurden die Zellen

- a) mit zellwandabbauendem Enzym (Glucuronidase) und
  - b) mit Phagenantiserum behandelt
- und erst dann auf Phagen hin untersucht.

### 1.2.1. Nachweis von intrazellulären Phagen in enzymbehandelten Neurosporangzellen.

Wie unter B.35.1. beschrieben, wurde die Zellwand von heterokaryotischem tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Mycel, nach 1-2 tägiger Anzucht in Gegenwart von  $\lambda$ ptrp-Phagen und anschließender Entfernung nicht gebundener Phagen durch Waschen, mittels des Schneckenenzym Glucuronidase angedaut. Die behandelten Zellen wurden abzentrifugiert (Überstand= $\ddot{U}_1$ ), 2 x gewaschen (Waschwasser 1 =  $\ddot{U}_2$ , Waschwasser 2 =  $\ddot{U}_3$ ) und durch Zugabe von  $H_2O$  und nachfolgende Ultraschallbehandlung homogenisiert (= P). Die Anzahl der in  $\ddot{U}_1$ ,  $\ddot{U}_2$ ,  $\ddot{U}_3$  und P enthaltenen Phagen wurde biologisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt: Die Summe der Phagen in  $\ddot{U}_1$ ,  $\ddot{U}_2$ ,  $\ddot{U}_3$  und P gibt an, wieviele Phagenpartikel nach 1 bzw. 2 tägiger Inkubation intra- und extrazellulär mit den Neurosporangzellen assoziiert sind. Bezieht man diese Werte auf die Anzahl der zugesetzten Phagen (= 100%), so zeigt sich, daß nach 1 tägiger Inkubation 0,01 - 0,0002 %, nach 2 tägiger Inkubation 0,05 - 0,01% der ursprünglich zugesetzten Phagen an die Pilzzellen gebunden sind. Das Vorhandensein von Phagenpartikeln in  $\ddot{U}_1$ ,  $\ddot{U}_2$  und  $\ddot{U}_3$  deutet darauf hin, daß eine merkliche Anzahl von Phagen nur extrazellulär an die Zellen gebunden ist und durch Andauen der Zellwand freigesetzt werden kann (ca. 25% nach 1 tägiger Inkubation, ca. 40% nach 2 tägiger Inkubation, bezogen auf die Summe der insgesamt gebundenen Phagen = 100%). Dabei ist zu berücksichtigen, daß in diesen Werten auch die Phagen enthalten sind, die durch Platzen der enzymbehandelten Zellen freigesetzt wurden.

Das Auftreten von biologisch nachweisbaren Phagen in den homogenisierten Zellen (= P), deutet darauf hin, daß Neurosporangzellen während der Heterokaryonbildung mit Bacte-

Tabelle 1

Nachweis von Phagen in Form von "plaque-forming-units" (p.f.u.) in hetero-  
karyotischen tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Neurosporazellen nach 1 tägiger  
Inkubation mit  $\lambda$ ptrp-Phagen.

Entfernung der extrazellulär mit der Zellwand assoziierten Phagen durch  
Enzymbehandlung.

| p.f.u. im Inkub.-<br>medium z. Beginn<br>d. Inkub. $\times 10^7$ | p.f.u. in<br>$\bar{U}_1 + \bar{U}_2 + \bar{U}_3 + P$<br>$\times 10^4$ | p.f.u. in<br>$\bar{U}_1 \times 10^2$ | p.f.u. in<br>$\bar{U}_2 \times 10^2$ | p.f.u. in<br>$\bar{U}_3 \times 10^2$ | p.f.u. in<br>$P \times 10^2$ |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| 445                                                              | 103                                                                   | 1400                                 | 310                                  | 200                                  | 8300                         |
| 44,5                                                             | 11                                                                    | 200                                  | 40                                   | 35                                   | 800                          |
| 465                                                              | 12                                                                    | 180                                  | 66                                   | 36                                   | 900                          |
| 650                                                              | 1,7                                                                   | 56                                   | 17                                   | 7                                    | 90                           |
| 850                                                              | 111                                                                   | 800                                  | 240                                  | 16                                   | 10000                        |

Mittelwert in % bez. auf p.f.u.  
in  $\bar{U}_1 + \bar{U}_2 + \bar{U}_3 + P = 100\%$

+/- 2 6                      9                      3                      1,3                      12

Anmerkung: Die angegebenen Mittelwerte wurden aus 5 unabhängig von einander durchge-  
führten Versuchen ermittelt.

Tabelle 2

Nachweis von Phagen in Form von "plaque forming units" (p.f.u.) in heterokaryotischen tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Neurosporaellen nach 2-tägiger Inkubation mit  $\lambda$ trp-Phagen.

Entfernung der extrazellulär mit der Zellwand assoziierten Phagen durch Enzymbehandlung.

| p.f.u. im Inkub.-<br>medium z. Beginn<br>d. Inkub. $\times 10^7$                      | p.f.u. in<br>$\bar{U}_1 + \bar{U}_2 + \bar{U}_3 + P$<br>$\times 10^4$ | p.f.u. in<br>$\bar{U}_1 \times 10^2$ | p.f.u. in<br>$\bar{U}_2 \times 10^2$ | p.f.u. in<br>$\bar{U}_3 \times 10^2$ | p.f.u. in<br>$P \times 10^2$ |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| 445                                                                                   | 253                                                                   | 5120                                 | 2290                                 | 853                                  | 17000                        |
| 44,5                                                                                  | 4,9                                                                   | 70                                   | 15                                   | 6                                    | 400                          |
| 850                                                                                   | 110                                                                   | 4800                                 | 1470                                 | 712                                  | 4000                         |
| Mittelwert in % bez. auf p.f.u.<br>in $\bar{U}_1 + \bar{U}_2 + \bar{U}_3 + P = 100\%$ |                                                                       | 26                                   | 8,5                                  | 3,3                                  | 61                           |
| +/- 2 $\sigma$                                                                        |                                                                       | 18                                   | 6                                    | 3                                    | 27                           |

Anmerkung: Die angegebenen Mittelwerte wurden aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen ermittelt.

riophagen infiziert werden können. Zumindest ein Teil der Phagen wird dabei nicht sofort durch neurospora-eigene Enzyme inaktiviert. Die intrazellulären Phagen betragen ca. 75% ( 1 tägige Inkubation) bzw. ca. 60% ( 2 tägige Inkubation) der mit den Zellen assoziierten Phagen.

#### 1.2.2. Nachweis von intrazellulären Phagen in phagenantiserum-behandelten Neurosporazellen.

Eine andere Möglichkeit extrazellulär an Neurospora gebundene Phagen zu entfernen besteht darin, diese durch Zugabe von Phagenantiserum zu inaktivieren. Antiserum gegen ein  $\phi 80$ - $\lambda$ dhis/Helferphagengemisch wurde, wie unter B.36. beschrieben, gewonnen und gemäß B.37. titriert. Dabei zeigte sich, daß nach 60min. Inkubation durch 0,1ml eines 1/320 verdünnten Antiserums ca. 100 Phagen bzw. durch 0,1ml unverdünntes Serum bis zu  $1 \times 10^6$  Phagen vollständig inaktiviert werden können (Verlust der Plaquebildungsfähigkeit).

Heterokaryotisches tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Mycel, das einen Tag mit einem  $\phi 80$ - $\lambda$ dhis/Helferphagengemisch inkubiert worden war, wurde nach Entfernen der nicht assoziierten Phagenpartikel unterschiedlich lange mit Antiserum behandelt und anschließend wie unter B.35.2. beschrieben homogenisiert und titriert. Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Die 0 min. Werte zeigen an, wieviele Phagen intra- und extrazellulär nach 1 tägiger Inkubation an die Pilzzellen gebunden sind. Die Rate beträgt 0,01 - 0,02% bezogen auf die Phagenmenge, die zu 5ml Inkubationsmedium zugegeben wurde. Behandelte man die Zellen 15 min. mit Antiserum, so nahm die Anzahl plaquebildender Partikel verglichen mit dem 0-Wert um ca. 20% ab. Nach 30min. Serumbehandlung betrug sie nur mehr ca. 57%. Dieser Wert wur-



de auch nach Ausdehnung der Behandlungszeit auf 60 min. nicht mehr wesentlich unterschritten. Dies deutet darauf hin, daß 30 min. ausreichen um sämtliche zellwandgebundenen Phagenpartikel zu inaktivieren.

### 1.3. Bestimmung der Phagenanzahl in den Neurosporazellen.

Um die Multiplizität der Phagen pro Neurosporazelle zu berechnen, mußte zunächst die Anzahl der Zellen nach Inkubationsabschluß bestimmt werden. Dies geschah durch Subtrahieren des Trockengewichts vom Naßgewicht. Die Differenz betrug bei jedem Inkubationsansatz ca. 200mg, was einem Volumen von 200  $\mu$ l entspricht. Das Volumen einer Mycelzelle beträgt ca.  $25 \times 10^{-6} \mu$ l ( $\phi = 20 \mu$ ,  $l = 80 \mu$ ). Somit errechnet sich für 200  $\mu$ l eine Zellzahl von ca.  $8 \times 10^6$ .

Demnach befindet sich in heterokaryotischen try-1, his-1A/try-1, his-5A Mycelien, nach Entfernung von extrazellulär gebundenen Phagen durch Enzymbehandlung, in jeder 10. - 100. Zelle (1 tägige Inkubation) bzw. in jeder 5. - 250. (2 tägige Inkubation) ein aktiver Phage, in heterokaryotischen try-1, his-1A/ad-4, his-1A Mycelien nach Antiserumbehandlung in jeder 70. - 400. Zelle.

### 1.4. Bestimmung der Phageninaktivierung in den Neurosporazellen.

Aus den in 1.2.1. und 1.2.2. erläuterten Versuchen geht hervor, daß aus phageninkubierten Neurosporazellen biologisch aktive Partikel reisoliert werden können. Es sollte nun geprüft werden, wie lange deren Plaquebildungsfähigkeit nach Inkubationsabschluß in den Pilzzellen erhalten bleibt. Dies geschah, wie unter B.38. angegeben, indem entweder sofort nach Inkubationsabschluß (= 0-Wert) oder erst nach 1, 3 bzw. 5 tägigem Weiterzüchten in phagenfreiem Medium die Phagenkonzentration in den gewaschenen

und enzymbehandelten Neurosporazellen bestimmt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in Abbildung 1 graphisch dargestellt.

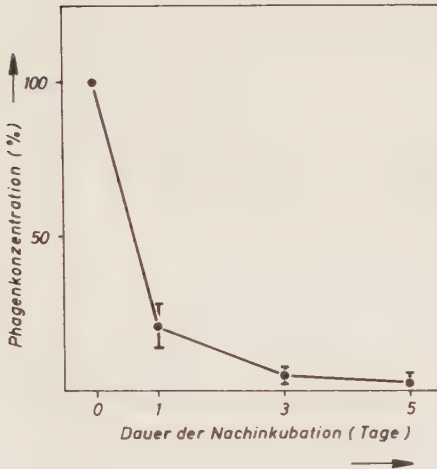


Abb. 1.

Inaktivierung der  
Phagen in den  
Neurosporazellen.

Nach 1 tägiger Nachinkubation betrug die Anzahl der plaquebildenden Partikel nur mehr ca. 20%, nach weiteren 2 Tagen ca. 5% und am 5. Tag ca. 2% in Bezug auf den 0-Wert (= 100%).

Dies bedeutet, daß intrazelluläre Phagen in Neurospora kontinuierlich inaktiviert werden. Eine Diffusion aktiver Phagen aus den Zellen in das Kulturmedium fand nicht statt, da in letzterem keine p.f.u. nachgewiesen werden konnten. Eine Vermehrung der Phagen wie in ihrem natürlichen Wirt E. coli findet, jedenfalls im untersuchten Zeitraum von 5 Tagen, nicht statt.

## 2. Aufnahme von Phagen-DNS in Neurosporaazellen.

Nachdem sich gezeigt hatte, daß ganze Phagenpartikel von Neurosporaazellen während des Vorgangs der Heterokaryosis aufgenommen werden (vgl. 1.2.1. und 1.2.2.) sollte nun geprüft werden, ob in gleicher Weise auch eine Aufnahme von Phagen-DNS erfolgt. Zunächst wurde jedoch in Vorversuchen

- a) die Qualität der verwendeten DNS (Reinheitsgrad und Molekulargewicht),
- b) ihre Abbaurate im Inkubationsmedium und
- c) ihre etwa zu erwartende Abbaurate in den Neurosporaazellen untersucht.

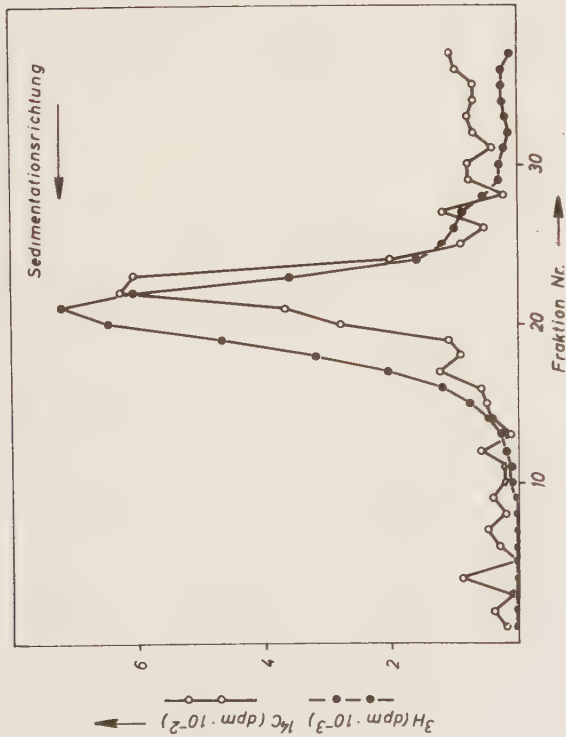
### 2.1. Qualität der Phagen-DNS.

Die Phagen-DNS wurde, wie unter B.21. beschrieben, aus ganzen Phagenpartikeln mittels Phenol extrahiert. Der Reinheitsgrad wurde mit Hilfe des Quotienten  $E_{260} / E_{280}$  (vgl. B.26.) bestimmt. Letzterer betrug bei den verschiedenen DNS-Präparationen 1,8 - 2,1. Dies besagt, daß die erhaltene DNS weitgehend frei von Proteinen war.

Um zu prüfen, ob mit der angewandten Methode eine intakte Phagen-DNS (Molekulargewicht der  $\lambda$  Wildtyp-DNS =  $30,8 \times 10^6$ ) gewonnen wurde, wurde radioaktiv markierte Phagen-DNS, extrahiert aus  $^3\text{H}$ -Thymidin markierten Phagenpartikeln (vgl. B.17.2.2.2.) zusammen mit  $^{14}\text{C}$ -markierter Referenz-DNS der P22 Phagenmutante H5, Molekulargewicht =  $27 \times 10^6$ , im neutralen 5-20%igen Sucrose-Gradienten zentrifugiert (vgl. B.29.). Das Ergebnis der Zentrifugation zeigt Abbildung 2. In ihr sind ein  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivitätspeak der Referenz-DNS, sowie ein schneller sedimentierender  $^3\text{H}$ -Radioaktivitätspeak der  $\lambda_{\text{ptrp}}$ -DNS zu erkennen. Dies besagt, daß die

Abb. 2

Molekulargewichtsbe-  
stimmung der  $\lambda$ trp-DNS  
im neutralen Sucrose-  
Gradienten unter Ver-  
wendung von H5-DNS als  
Referenz.



●  $\lambda$ trp-DNS  
( $^3\text{H}$ -markiert),  
○ H5-DNS  
( $^{14}\text{C}$ -markiert).

$\lambda$ ptp-DNS nicht fragmentiert ist (in diesem Fall würde eine Verschmierung mehrerer  $^3\text{H}$ -peaks zu sehen sein) und ihr Hauptanteil ein Molekulargewicht von ca.  $32 \times 10^6$  besitzt (Berechnung siehe B.32.).

## 2.2. Bestimmung der Abbaurate von Phagen-DNS in verschiedenen Inkubationsmedien.

Da Neurosporazellen DNS-abbauende Enzyme in das Kulturmedium sekretieren (vgl. Hasunuma, 1973), mußte für die Inkubationsversuche mit  $\lambda$ ptp-DNS ein Medium gewählt werden, in welchem der Abbau der zugesetzten DNS weitgehend unterbunden wird. So wurde zunächst die Abbaurate der Phagen-DNS, wie unter B.41. beschrieben, bestimmt in Kulturmedium von heterokaryotischem tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Mycel (Sucrose-Minimalmedium, pH 6,0), supplementiert mit

- a) EDTA (zur Bindung 2 wertiger Ionen, welche zur Aktivierung extrazellulärer Nucleasen nötig sind (Hasunuma, 1973));
- b) EDTA + TMP (Phosphat reprimiert extrazelluläre Nucleasen (Hasunuma, 1973));
- c) EDTA + TMP + DEAE-Dextran (das polykationische Dextranderivat, Molekulargewicht 500 000, schützt DNS vor DNase-Angriff (Maes et al., 1967)).

Dies geschah, indem jeweils 0,9ml der angeführten Medien bzw. zur Kontrolle SSC-Puffer (vgl. B.3.7.) mit 0,1ml  $^3\text{H}$ -markierter  $\lambda$ ptp-DNS (Endkonz. ca.  $2 \mu\text{g/ml}$ ) vermischt und die säurefällbare Radioaktivität nach 1 tägiger Inkubation bei  $25^\circ\text{C}$  gemessen wurde. Die so ermittelten Werte wurden in % der Pufferkontrolle (= 100%) ausgedrückt und sind aus Tabelle 4 zu ersehen. Man erkennt, daß in Kulturmedium, dem EDTA zugegeben worden war, mehr als die Hälfte der Phagen-DNS zu säurelöslichen Fragmenten abgebaut wurde. Dieser Abbau konnte durch Zugabe von

Tabelle 4

Messung der säurefällbaren Radioaktivität nach 1 tägiger Inkubation von  $^3\text{H}$ -markierter  $\lambda$ ptp-DNS in unterschiedlich supplementierten Kulturmedien von *Neurospora crassa*.

|                                                                 | SSC-Puffer<br>(Kontr.) | Kulturmedium + |          |                           | Exp. |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------|----------------|----------|---------------------------|------|
|                                                                 |                        | EDTA           | EDTA+TMP | EDTA+TMP+<br>DEAE-Dextran |      |
| TCA-fällb. Radioaktiv. in cpm                                   | 66825                  | 29403          | 43221    | 63484                     | 1    |
|                                                                 | 30149                  | 13567          | 22463    | 29541                     | 2    |
|                                                                 | 24757                  | 9405           | 16836    | 23512                     | 3    |
| TCA-fällb. Radioaktivität in %, bez. auf den Pufferwert = 100 % |                        | 44             | 65       | 95                        | 1    |
|                                                                 |                        | 45             | 74       | 98                        | 2    |
|                                                                 |                        | 38             | 66       | 95                        | 3    |
| Mittelwert in %                                                 |                        | 42             | 68       | 96                        |      |
| +/- 2 $\sigma$                                                  |                        | 4,4            | 5,7      | 2                         |      |

Anmerkung: Die angegebenen Mittelwerte wurden aus 3 unabhängig von einander durchgeführten Versuchen ermittelt.

TMP auf ca. 30% reduziert werden. Bei zusätzlicher Supplementierung mit DEAE-Dextran lag nahezu die gesamte DNS noch in säurefällbarer Form vor, nur ca. 5% waren säurelöslich. Von den 3 untersuchten Medien ist somit letzteres für Inkubationsversuche mit Phagen-DNS am besten geeignet.

### 2.3. Bestimmung der Abbaurate von Phagen-DNS in Neurospora-extrakten.

Eine Inkubation von Neurosporazellen mit Phagen-DNS ist, in Hinblick auf spätere Transformationsexperimente, nur dann sinnvoll, wenn zumindest ein Teil der applizierten DNS über einen längeren Zeitraum in hochmolekularer Form erhalten bleibt. Deshalb wurde zunächst durch in vitro Versuche die intrazellulär zu erwartende Abbaurate von Phagen-DNS und zwar sowohl von der linearen Form, als auch von 2 Ringformen ("Hershey circles" und geschlossene Ring-DNS), bestimmt.

Als "Hershey circles" (Hershey et al., 1963) bezeichnet man monomere Ringmoleküle, die unter geeigneten Bedingungen aus linearer  $\lambda$ DNS durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen den komplementären, 12 Nucleotide umfassenden "sticky ends" gebildet werden können.



lineares, monomeres  
Molekül



intermediäres  
Stadium



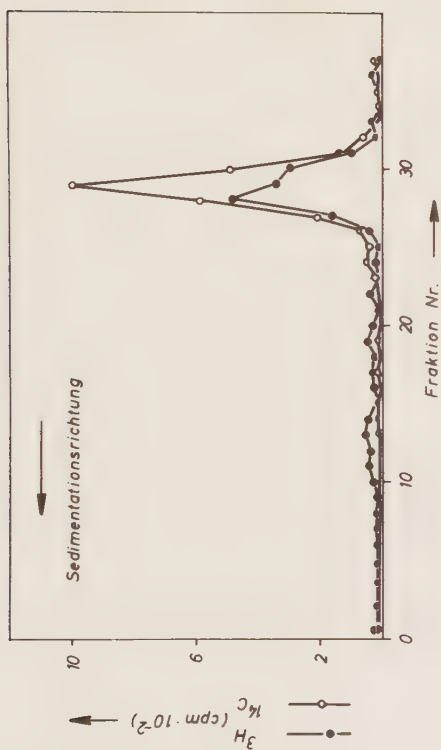
circuläres,  
Molekül

Die in den Versuchen verwendeten "Hershey circles" wurden, wie unter B.23. beschrieben, präpariert und als solche, auf Grund ihres gegenüber linearer  $\lambda$ DNS veränderten Se-

Abb. 3

Nachweis von  
"Hershey circles" durch  
Zentrifugation im neu-  
tralen Sucrose-Gradienten  
unter Verwendung von  
linearer  $\lambda$ ptp-DNS als  
Referenz.

● "Hershey circles"  
( $^3\text{H}$ -markiert),  
○ lineare  $\lambda$ ptp-DNS  
( $^{14}\text{C}$ -markiert).



dimentationsverhaltens im neutralen Sucrose-Gradienten (Hershey et al., 1963) identifiziert. Die Zentrifugationsbedingungen sind in B.29. angegeben.

In Abbildung 3 ist das Profil eines solchen Gradienten aufgetragen. Neben einem  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivitätspeak der linearen  $\lambda$ -Referenz-DNS ist ein  $^3\text{H}$ -Radioaktivitätspeak, dessen Maximum um eine Fraktion in Sedimentationsrichtung verschoben ist und der eine deutliche Schulter aufweist, zu erkennen. Diese Schulter deutet darauf hin, daß die Umsetzung von linearer DNS in "Hershey circles" nicht quantitativ erfolgt ist. Durch Planimetrieren der Flächen zwischen den Fraktionen 26 - 29 bzw. 29 - 32 konnte der Anteil linearer  $\lambda$ -DNS-Moleküle errechnet werden. Er betrug ca. 40%.

Geschlossene Ring-DNS wurde, wie unter B.22. beschrieben, aus  $\lambda$ -infizierten Bakterienzellen durch vorzeitige enzymatische Lyse gewonnen (Young und Sinsheimer, 1964). Von den übrigen DNS-Molekülen (lineare und genickte  $\lambda$ -DNS, bakterielle DNS) wurde sie durch Zentrifugation im neutralen  $\text{CsCl}$ -Ethidiumbromid-Dichtegradienten abgetrennt. Sie bandiert dabei, wie aus Abbildung 4 zu ersehen ist, im Vergleich zu linearer DNS in einem Bereich höherer Dichte. Dies ist auf die bevorzugte Einlagerung von Ethidiumbromid in lineare DNS und deren daraus resultierende Dichteverminderung zurückzuführen. Die isolierte DNS sedimentierte im alkalischen 5-20%igen Sucrose-Gradienten 3,5 mal schneller als lineare  $\lambda$ -DNS (siehe Abbildung 5, Zentrifugationsbedingungen vgl. B.30.). Dies ist ein Beweis dafür, daß es sich tatsächlich um circuläre  $\lambda$ -DNS handelt (Young und Sinsheimer, 1967, Gellert, 1971).

Um den Abbau von linearer  $\lambda$ -DNS, "Hershey circles" und geschlossener Ring-DNS in vitro zu messen, wurde  $^3\text{H}$ -mar-

Abb. 4

Abtrennung circularer  $\lambda$ ptp-DNS von linearer  
DNS durch Zentrifugation im neutralen CsCl-  
Ethidumbromid-Dichtegradienten.

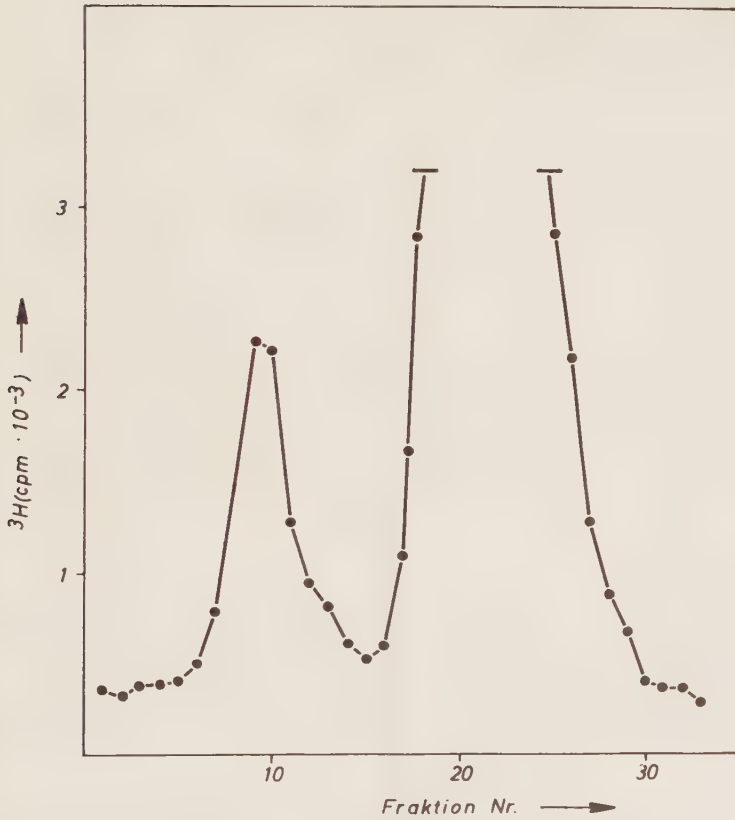
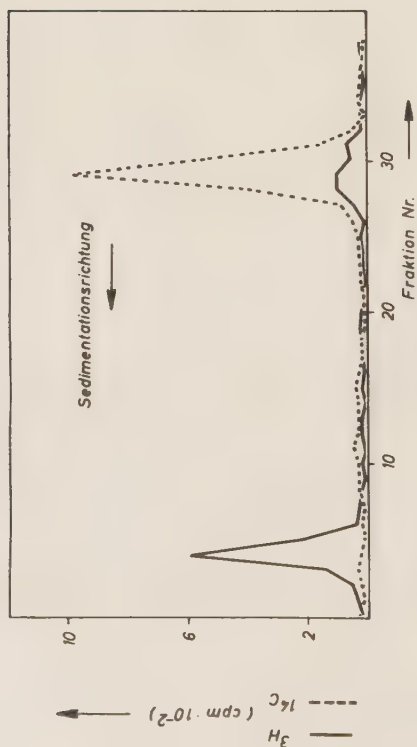


Abb. 5

Nachweis von geschlossener Ring-DNS durch Zentrifugation im alkalischen Sucrose-Gradienten unter Verwendung von linearer  $\lambda$ ptp-DNS als Referenz.

— geschlossene Ring-DNS ( $^3\text{H}$ -markiert),  
 --- lineare  $\lambda$ DNS ( $^{14}\text{C}$ -markiert).



kierte DNS mit Extrakten der Mutante tryp-1 inkubiert. Die Proteinendkonzentration betrug 1,4mg/ml, die DNS-Endkonzentration ca. 1,7  $\mu$ /ml. Nach 0 min., sowie nach 1, 3 und 6 stündiger Inkubation wurde die säurefällbare Radioaktivität bestimmt (vgl. B.40.). Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 5a zusammengestellt.

Nach 1 stündiger Inkubation lagen noch ca. 76% der ursprünglich zugesetzten linearen DNS in säurefällbarer Form vor. "Hershey circles" wurden bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgebaut (99% TCA-fällbar), geschlossene Ring-DNS dagegen zur Hälfte. Nach weiteren 2 Stunden Inkubation waren noch 67% der linearen DNS, 93% der "Hershey circles" und 40% der geschlossenen Ring-DNS, nach 6 stündiger Inkubation 43% der linearen DNS, nur mehr 20% der geschlossenen Ring-DNS, aber noch 83% der "Hershey circles" säurefällbar. Auf die möglichen Ursachen der unterschiedlichen Abbauraten wird in der Diskussion näher eingegangen.

Wurde den Inkubationsgemischen zusätzlich jeweils 100  $\mu$ /ml DEAE-Dextran beigelegt, so zeigte sich eine deutliche Abnahme der DNS-Abbauraten. So waren nach 6 stündiger Inkubation nur ca. 10% der linearen DNS und der geschlossenen Ring-DNS und ca. 5% der "Hershey circles" in die säurelösliche Form übergeführt worden (vgl. Tabelle 5b).

---

#### Anmerkung zu den Tabellen 5a und 5b:

Die angegebenen Mittelwerte ( MW ) wurden aus 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen errechnet.

---

Die Experimente, deren Ergebnisse in den Tabellen 5a und 5b zusammengestellt sind, wurden zusammen mit Frau I. Nordenholz durchgeführt.

Tabelle 5a Abbau von <sup>3</sup>H-markierter 2pnp-DNS zu säurelöslichem Material in Extrak-  
ten der Neurospora Mutante tryp-1.

| Experiment | Inkubation mit | O-Wert in cpm | Inkub.dauer i.Std. |    |     |              |
|------------|----------------|---------------|--------------------|----|-----|--------------|
|            |                |               | 1                  | 3  | 6   |              |
| 1          |                | 5875          | 67                 | 62 | 31  | Radioaktiv.  |
| 2          | linearer       | 4041          | 85                 | 71 | 49  | in %, bez.a. |
| 3          | DNS            | 3540          | 70                 | 63 | 41  | d. O-Wert =  |
| 4          |                | 3790          | 80                 | 72 | 52  | ← 100 %      |
|            |                |               | 76                 | 67 | 43  | ← MW i. %    |
|            |                |               | 8                  | 5  | 9   | ← +/- 26     |
| 1          |                | 1116          | 90                 | 89 | 73  | Radioaktiv.  |
| 2          | "Hershey       | 933           | 93                 | 91 | 73  | in %, bez.a. |
| 3          | circles"       | 4260          | 105                | 92 | 92  | d. O-Wert =  |
| 4          |                | 4901          | 107                | 99 | 95  | ← 100 %      |
|            |                |               | 99                 | 93 | 83  | ← MW i. %    |
|            |                |               | 9                  | 4  | 12  | ← +/- 25     |
| 1          |                | 1031          | 40                 | 33 | 16  | Radioaktiv.  |
| 2          | geschlossene   | 1262          | 61                 | 50 | 26  | in %, bez.a. |
| 3          | Ring-DNS       | 1681          | 49                 | 30 | 18  | d. O-Wert =  |
| 4          |                | 1708          | 52                 | 45 | 22  | ← 100 %      |
|            |                |               | 51                 | 40 | 21  | ← MW i. %    |
|            |                |               | 9                  | 10 | 4,5 | ← +/- 26     |

Tabelle 5b Abbau von  $^3\text{H}$ -markierter  $\lambda$ -trp-DNS zu säurelöslichem Material in Extrak-  
ten der Neurospora Mutante tryp-1 in Gegenwart von DEAE-Dextran.

| Experiment | Inkubation mit | O-Wert in cpm | Inkub.dauer i.Std. |     |     |              |
|------------|----------------|---------------|--------------------|-----|-----|--------------|
|            |                |               | 1                  | 3   | 6   |              |
| 1          |                | 5689          | 84                 | 86  | 72  | Radioaktiv.  |
| 2          | lineare        | 4204          | 80                 | 96  | 79  | in %, bez.a. |
| 3          | DNS            | 3110          | 110                | 111 | 100 | d. O-Wert =  |
| 4          |                | 3710          | 110                | 97  | 95  | ← 100 %      |
|            |                |               | 96                 | 97  | 87  | ← MW i. %    |
|            |                |               | 16                 | 10  | 13  | ← +/- 25     |
| 1          |                | 1165          | 82                 | 89  | 89  | Radioaktiv.  |
| 2          | "Hershey       | 986           | 95                 | 88  | 94  | in %, bez.a. |
| 3          | "circles"      | 4090          | 110                | 100 | 103 | d. O-Wert =  |
| 4          |                | 4810          | 103                | 97  | 100 | ← 100 %      |
|            |                |               | 98                 | 96  | 96  | ← MW i. %    |
|            |                |               | 12                 | 7   | 8   | ← +/- 25     |
| 1          |                | 1051          | 100                | 94  | 104 | Radioaktiv.  |
| 2          | geschlossen    | 1350          | 81                 | 77  | 74  | in %, bez.a. |
| 3          | Ring-DNS       | 1666          | 101                | 95  | 93  | d. O-Wert =  |
| 4          |                | 1757          | 91                 | 91  | 84  | ← 100 %      |
|            |                |               | 93                 | 89  | 89  | ← MW i. %    |
|            |                |               | 9                  | 8   | 13  | ← +/- 25     |

## 2.4. Nachweis von DNS in den Neurosporaazellen.

Um festzustellen, ob Phagen-DNS in Neurosporaazellen aufgenommen werden kann, wurde heterokaryotisches tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Mycel einen Tag lang in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -markierter linearer  $\lambda$ -DNS angezüchtet. Nach Inkubationsabschluß wurde der Hauptanteil der extrazellulären DNS durch Waschen entfernt und der noch verbleibende Rest mit pankreatischer DNase verdaut. Die Zellen wurden nach mehrmaligem Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgeschlossen, mit TCA behandelt und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt (vgl. B.42.). Die Ergebnisse sind aus Tabelle 6 zu ersehen.

Tabelle 6

Säurefällbare Radioaktivität in den Neurospora-  
zellen nach 1 tägiger Inkubation mit  $^3\text{H}$ -mar-  
kierter  $\lambda$ -DNS.

| $^3\text{H}$ -DNS-Konz.i.<br>Inkub.med.pro<br>Inkub.ansatz<br>in $\mu$ | Radioaktiv.i.<br>Inkub.med.<br>pro Inkub.ans.<br>i. cpm ( =A) | TCA-fällb.<br>Radioaktiv.<br>i.d.Zellen<br>i.%, bez.a.<br>A = 100% |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 10                                                                     | 23960                                                         | 9                                                                  |
| 25                                                                     | 49010                                                         | 11                                                                 |
| 25                                                                     | 57050                                                         | 7                                                                  |

Dabei zeigte sich, daß nach 1 tägiger Inkubation mit 10  $\mu$  DNS 9% davon in den Neurosporaazellen als säurefällbares Material vorlagen. Nach Erhöhung der DNS-Konzentration im Inkubationsmedium auf 25  $\mu$  war die Aufnahmerate nicht gesteigert worden. Sie betrug 7% bzw. 11%.

2.5. Verteilung der Radioaktivität in  $^3\text{H}$ - $\lambda$ ptrp-DNS behandelten Neurosporangzellen.

Um genauere Angaben über die Verteilung der  $^3\text{H}$ -Radioaktivität in den Neurosporangzellen, die einen Tag mit  $^3\text{H}$ -markierter  $\lambda$ ptrp-DNS behandelt worden waren, zu erhalten, wurden die Zellen nach Inkubationsabschluß durch differentielle Zentrifugation in subzelluläre Fraktionen - Kerne, Mitochondrien, Zytoplasma - zerlegt (vgl. B.43.). Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde in Triton-Toluol bestimmt. Die so ermittelten Werte mußten, da sie unterschiedlich gequenchet wurden, wie unter B.43.5. beschrieben, korrigiert werden. Sie sind in Tabelle 7 zusammengestellt und geben die gesamte Radioaktivität (säurefällbar und säurelöslich) in den Zellkompartimenten an.

Nach 1 tägiger Inkubation mit 5 - 10  $\mu\text{g}$   $^3\text{H}$ -markierter  $\lambda$  DNS wurden ca. 8% der ursprünglich zugesetzten Radioaktivität in den Zellen nachgewiesen. 25% davon waren mit den Kernfraktionen, ca. 2% mit den Mitochondrienfraktionen assoziiert. Der Hauptanteil an Radioaktivität, 74%, wurde im Zytoplasma gefunden.

---

Anmerkungen zu Tabelle 7.

Für die Untersuchungen wurden Mycelien aus jeweils 10 Inkubationsansätzen ( 5ml Medium / Ansatz) gesammelt und aufgearbeitet (Naßgewicht der Mycelien / Ansatz ca. 200  $\mu\text{g}$ ).

Die angegebenen Mittelwerte wurden aus 3 unabhängig von einander durchgeführten Versuchen errechnet.

---

Tabelle 7 Verteilung der Radioaktivität in den Neurospora-Zellen nach 1 tägiger Inkubation mit <sup>3</sup>H-markierter Aptrp-DNS.

|                                                                       | Experiment |       |       | Mittelwert in %<br>bez. a. A = 100% | +/-<br>2σ |
|-----------------------------------------------------------------------|------------|-------|-------|-------------------------------------|-----------|
|                                                                       | 1          | 2     | 3     |                                     |           |
| Radioaktivität pro 50ml Inkub.med. zu Beginn der Inkub. in cpm ( =A ) | 33101      | 83334 | 75115 |                                     |           |
| Radioaktivität in den Zellen (pro 2g Naßgewicht in cpm ( =B )         | 3265       | 6736  | 5502  | 8,4                                 | 1,54      |
| Radioaktivität in den Kernen (isol. a. 2g Naßgewicht) in cpm          | 761        | 1583  | 1502  | 25                                  | 2,6       |
| Radioaktivität in den Mitochondrien (isol. a. 2g Naßgew.) in cpm      | 46         | 69    | 118   | 1,5                                 | 0,64      |
| Radioaktivität im Zytoplasma (isol. a. 2g Naßgew.) in cpm             | 2458       | 5084  | 3882  | 74                                  | 2,7       |

## 2.6. Dichtebestimmung von $^3\text{H}$ -markierter DNS, isoliert aus $^3\text{H}$ - $\lambda$ DNS inkubierten Neurospora-zellen.

In Abschnitt 2.4. konnte gezeigt werden, daß nach 1 tägiger Behandlung von Neurospora-zellen mit  $^3\text{H}$ -markierter  $\lambda$ -DNS ca. 10% der zugesetzten Radioaktivität intrazellulär in säurefällbarer Form vorliegen. Dies könnte auf

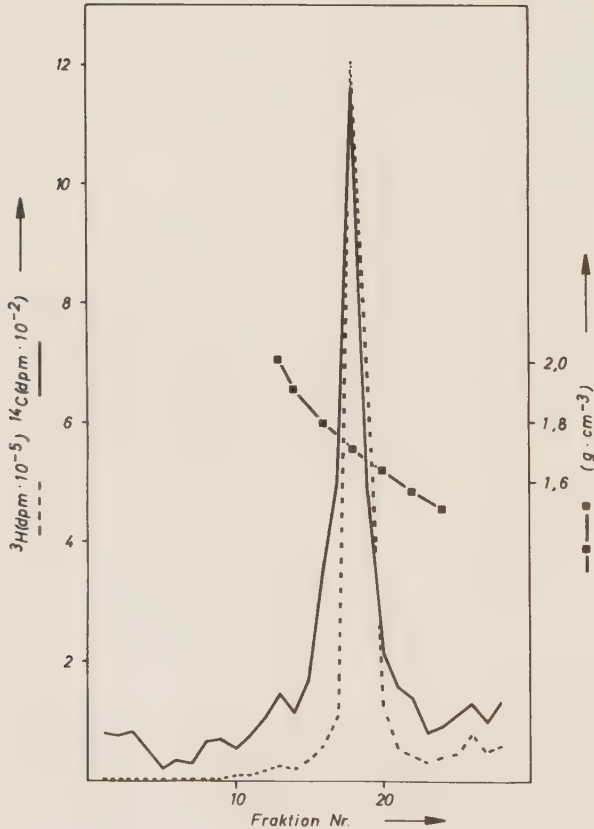
- a) freie hochmolekulare Phagen-DNS,
- b) Abbau der aufgenommenen Phagen-DNS und anschließenden Einbau der  $^3\text{H}$ -Nucleotide in die Pilz-DNS oder
- c) Integration von Phagen-DNS-Stücken in das Neurospora-genom zurückzuführen sein.

Unter der Voraussetzung, daß sich Neurospora - und Phagen-DNS bezüglich ihrer Dichte signifikant unterscheiden, könnte nach Isolierung und anschließender Zentrifugation der DNS aus Phagen-DNS inkubierten Neurospora-zellen im neutralen  $\text{CsCl}$ -Dichtegradienten, eine Entscheidung zwischen a) einerseits und b) und c) andererseits getroffen werden: In Fall a) würde die  $^3\text{H}$ -Radioaktivität bei einer für  $\lambda$ -DNS, in Fall b) bei einer für Neurospora-DNS charakteristischen Dichte bandieren. In Fall c) sollte die Radioaktivitätsbande, bei Einbau von größeren Phagen-DNS-Stücken in die Neurospora-DNS, in Richtung der Phagen-DNS-Dichte verschoben sein (intermediäre Bande).

In Vorversuchen wurde zunächst geprüft, ob der Dichteunterschied zwischen  $\lambda$ -DNS und Neurospora-DNS ausreicht, um diese beiden DNS-Species präparativ zu trennen. Die Dichte von Neurospora-DNS wurde durch Zentrifugation  $^{14}\text{C}$ -markierter Neurospora-DNS (vgl. B.25.) mit  $^3\text{H}$ -markierter E.coli-DNS (vgl. B.24.), deren Dichte  $1,7100 \text{ g cm}^{-3}$  beträgt (Schildkraut et

Abb. 6

Dichtebestimmung  $^{14}\text{C}$ -markierter Neurospora-DNS  
durch Zentrifugation im neutralen  $\text{CsCl}$ -Dichte-  
gradienten unter Verwendung von  $^3\text{H}$ -markierter  
E.coli-DNS ( $\rho = 1,7100$ ) als Referenz.



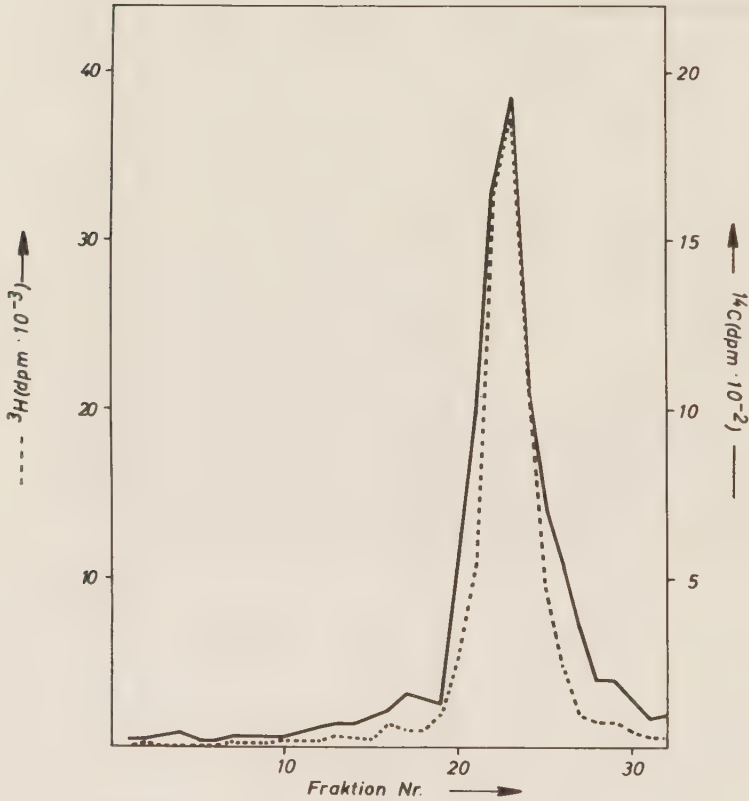
- Neurospora-DNS ( $^{14}\text{C}$ -markiert),  
- - - E.coli-DNS ( $^3\text{H}$ -markiert),  
■ — ■  $\rho$ -Werte, errechnet aus Refraktrometerablesungen.

al., 1962), im neutralen CsCl-Dichtegradienten (vgl. B.28.a.), Auswertung B.31.a.) und durch Refraktrometernmessungen (vgl. B.33.) bestimmt. Sie wurde, wie aus Abbildung 6 hervorgeht, als ca.  $1,71 \text{ g cm}^{-3}$  ermittelt. Da  $\lambda$ -DNS ebenfalls eine Dichte von  $1,71 \text{ g cm}^{-3}$  besitzt, konnte sie durch Zentrifugation im neutralen CsCl-Dichtegradienten nicht von Neurospora-DNS getrennt werden (vgl. Abbildung 7). Die Zentrifugationsbedingungen sind in B.28.b. angegeben.

Dichtezentrifugation von DNS, die nach Inkubation von Neurosporazellen mit Phagen-DNS aus den Pilzzellen isoliert wurde, ist somit nicht die geeignete Methode um zwischen den oben angeführten Möglichkeiten a), b) und c) zu unterscheiden. Erhält man nach Zentrifugation von DNS, die aus  $^3\text{H}$ - $\lambda$ -DNS inkubierten Neurosporazellen isoliert worden war, einen  $^3\text{H}$ -Radioaktivitätspeak, dessen Maximum mit dem einer  $^{14}\text{C}$ -markierten Neurospora-Referenz-DNS zusammenfällt, so geht daraus lediglich hervor, daß Phagen-DNS oder auch Nucleotide in die Pilzzellen aufgenommen wurden. Das Profil eines solchen Gradienten ist in Abbildung 8 aufgezeichnet. Die Zentrifugationsbedingungen wurden in B. 28.c. beschrieben.

Abb. 7

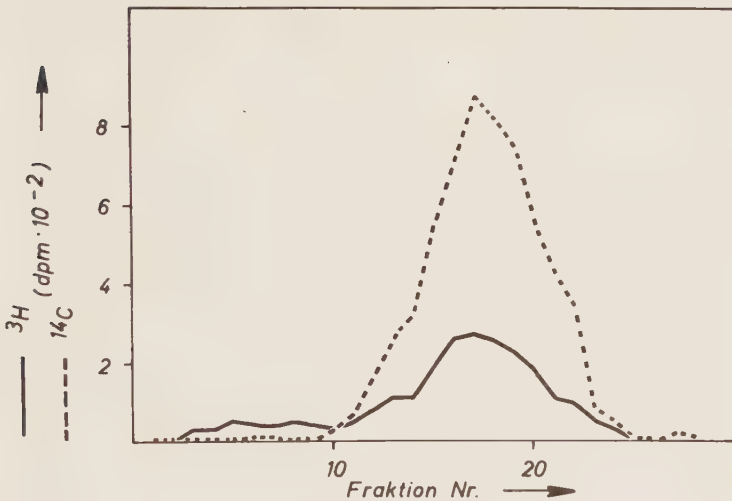
Lage der  $^3\text{H}$ -markierten DNS aus dem Phagen  $\lambda\text{ptrp}$ , sowie der  $^{14}\text{C}$ -markierten Neurospora-DNS, im neutralen  $\text{CsCl}$ -Dichtegradienten.



-----  $\lambda\text{ptrp}$ -DNS ( $^3\text{H}$ -markiert),  
————— Neurospora-DNS ( $^{14}\text{C}$ -markiert).

Abb. 8

Lage der DNS aus Neurosporazellen, die mit  $^3\text{H}$ - $\lambda$ ptrp-DNS behandelt worden waren, im neutralen  $\text{CsCl}$ -Dichtegradienten unter Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -markierter Neurospora-DNS als Referenz.



— DNS aus inkubierten Zellen ( $^3\text{H}$ -markiert),  
----- DNS aus nicht inkubierten Zellen ( $^{14}\text{C}$ -markiert).

### 3. Versuche zur Expression bakterieller Erbinformation in den Neurosporangzellen.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Neurosporangzellen unter geeigneten Bedingungen fremdes Erbmaterial aufnehmen (vgl. 1.2. und 2.4.), sollte nun geprüft werden, ob auch eine Ausprägung der übertragenen Erbinformation in den Pilzzellen möglich ist. Ein Hinweis darauf wäre das Auftreten tryptophanprototropher Neurosporangzellen nach Behandlung von tryp-1 Stämmen mit  $\lambda$ ptrp-Phagen bzw. deren DNS.

Für die Untersuchungen wurden als Empfänger heterokaryotische tryp-1, his-1A/tryp-1, his-5A Mycelien bzw. fragmentierte tryp-1a und tryp-1, his-1A Mycelien (nach Szabò und Schablik, 1973) verwendet. Als Spender dienten hochtransduzierende  $\lambda$ ptrp-Phagen (Transduktionsrate ca. 1/10, vgl. B.20.3.) bzw. deren DNS (linear, "Hershey circles", geschlossen circular). Die Applikation der Phagen bzw. der Phagen-DNS erfolgte wie unter B.34. beschrieben. Nach 1-3 Tagen wurden die inkubierten Zellen auf Glycerol complete Medium übergeführt und 4-10 Wochen weiter gezüchtet. Die entstandenen Konidien wurden geerntet, auf GFS-Minimalmedium ohne Tryptophan ausplattiert und die Platten nach 3 tägiger Bebrütung auf tryp<sup>+</sup>-Kolonien hin untersucht (vgl. B.44.2.).

Insgesamt wurden 53 derartige Experimente und ebenso viele Kontrollen durchgeführt. Dabei wurde 31 mal mit  $\lambda$ ptrp-Phagen und 22 mal mit  $\lambda$ ptrp-DNS inkubiert (vgl. Tabelle 8) bzw. zur Kontrolle 26 mal mit TMG-Puffer, 3 mal mit  $\lambda$ plac-Phagen, 3 mal mit  $\lambda$ -Wildtyp-Phagen, 16 mal mit SSC-Puffer, 3 mal mit  $\lambda$ plac-DNS und 3 mal

Tabelle 8 Zusammenstellung der Versuche zur Expression bakterieller Erbinformation in Neurospora crassa.

| Inkubation mit<br>→                               | $\lambda$ trp-Phagen | linearer<br>$\lambda$ trp DNS |             | "Hershey<br>circles" |             | geschl.circ. | Inkub.d.<br>i.Tagen |             |
|---------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------|-------------|----------------------|-------------|--------------|---------------------|-------------|
| Experimente →                                     | d.                   | e.                            | d.          | e.                   | d.          | e.           | d.                  | e.          |
| Inkubation von<br>↓                               |                      |                               |             |                      |             |              |                     |             |
| tryp-1a Mycel-<br>fragmenten                      | 8<br>6<br>3          | 3<br>3<br>0                   | 4<br>4<br>2 | 0<br>0<br>0          | -<br>-<br>- | -<br>-<br>-  | 1<br>2<br>3         |             |
| tryp-1, his-1A<br>Mycelfragmenten                 | 3                    | 1                             | 1           | 1                    | 3           | 1            | 3                   | 0           |
| tryp-1, his-1A/<br>tryp-1, his-5A<br>Heterokaryen | 6<br>3<br>2          | 3<br>2<br>2                   | -<br>2<br>- | -<br>2<br>-          | -<br>-<br>- | 3<br>-<br>-  | 0<br>-<br>-         | 1<br>2<br>3 |

Anmerkung: d. = durchgeführt, e. = erfolgreich.

mit  $\lambda$ Wildtyp-DNS.

Bei 15 der 31 mit  $\lambda$ ptrp-Phagen durchgeführten Experimenten traten makroskopisch sichtbare trypt<sup>+</sup>-Kolonien auf. Da jedoch bei einem Experiment (Inkubation von fragmentiertem trypt-1, his-1A Mycel) alle 3 abisolierten Kolonien nicht nur tryptophan-, sondern auch histidinprototroph waren, wurden nur 14 Versuche als erfolgreich gewertet (=45%). Die Inkubationsdauer schien ohne Bedeutung für die Erfolgsrate zu sein. Letztere betrug bei 1 tägiger Inkubation 41%, bei 2 tägiger 55% und bei 3 tägiger 40%.

Nach Inkubation mit  $\lambda$ ptrp-DNS wurden in 4 von 22 durchgeführten Experimenten trypt<sup>+</sup>-Kolonien gefunden, was einer Erfolgsrate von 18% entspricht. Eine der 3 trypt<sup>+</sup>-Kolonien, die nach Behandlung von fragmentiertem trypt-1, his-1A Mycel mit linearer  $\lambda$ ptrp-DNS erhalten wurden, erwies sich auch als histidinprototroph und wurde deshalb nicht gezählt.

In den Tabellen 9a und 9b wurden die erfolgreichen Experimente zusammengestellt. Wie aus Spalte 6 der Tabelle 9a bzw. Spalte 7 der Tabelle 9b zu ersehen ist, traten die trypt<sup>+</sup>-Kolonien mit einer Häufigkeit von 0,1 bis 5 pro  $10^7$  plattierte Konidien auf, wobei durch Erhöhung der Phagenkonzentration von  $1,5 \times 10^9$  auf  $4 \times 10^9$  bzw. der DNS-Konzentration von 3% auf 20% keine Steigerung der Rate der trypt<sup>+</sup>-Kolonien erzielt werden konnte.

Als Hauptursache der Tryptophanprototrophie kann eine spontane Reversion ausgeschlossen werden, da die spontane Reversionsrate der verwendeten trypt-1 Stämme als kleiner  $2 \times 10^{-9}$  ermittelt wurde (vgl. B. 44.1.).

Bei den Kontrollversuchen traten nach Behandlung mit TMG-Puffer, SSC-Puffer,  $\lambda$ plac-Phagen,  $\lambda$ plac-DNS und  $\lambda$ Wildtyp-DNS keine trypt<sup>+</sup>-Kolonien auf. Nach Behandlung mit  $\lambda$ Wildtyp-Phagen wurden bei einem der 3 Experimente und zwar nach Zugabe der Phagen zu fragmentiertem trypt-1, his-1A Mycel, 5 trypt<sup>+</sup>, his<sup>+</sup> Kolonien gefunden, die jedoch, auf Grund der Histidinprototrophie, als Wildtypkontamination gewertet und deshalb nicht näher analysiert wurden.

Tabelle 9a Zusammenstellung der erfolgreichen Versuche mit  $\Delta$ trp-Phagen.

| Inkub. dauer i. Tagen | Inkubation von | Anzahl d. zugesetz. Phagen $\times 10^9$ | Anzahl d. plattiert. Konidien $\times 10^7$ | Anzahl d. tryp <sup>+</sup> Kolonien | Rate d. tryp <sup>+</sup> Kolon. $\times 10^{-7}$ | Bezeichn. d. tryp <sup>+</sup> Kolonien |
|-----------------------|----------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1                     |                | 1,5                                      | 5                                           | 1                                    | 0,2                                               | N                                       |
|                       |                | 2                                        | 1                                           | 5                                    | 5                                                 | A <sub>1</sub> -A <sub>5</sub>          |
|                       | fragment.      | 4                                        | 42                                          | 12                                   | 0,3                                               | T <sub>1</sub> -T <sub>12</sub>         |
|                       | tryp-1a        | 2                                        | 1                                           | 1                                    | 1                                                 | A <sub>I</sub>                          |
| 2                     | Mycel          | 2                                        | 1                                           | 4                                    | 4                                                 | E <sub>1</sub> -E <sub>4</sub>          |
|                       |                | 4                                        | 42                                          | 40                                   | 1                                                 | R <sub>1</sub> -R <sub>40</sub>         |
|                       | fragment.      |                                          |                                             |                                      |                                                   |                                         |
| 1                     | tryp-1, his-1A | 2                                        | 2                                           | 5                                    | 2,5                                               | V <sub>1</sub> -V <sub>5</sub>          |
|                       | Mycel          |                                          |                                             |                                      |                                                   |                                         |
|                       | fragment.      |                                          |                                             |                                      |                                                   |                                         |
| 1                     | tryp-1, his-1/ | 1,5                                      | 5                                           | 1                                    | 0,2                                               | HS                                      |
|                       | tryp-1, his-5  | 1,5                                      | 10                                          | 7                                    | 0,7                                               | HS <sub>1</sub> -HS <sub>7</sub>        |
|                       | Heterokaryen   | 2                                        | 12                                          | 19                                   | 1,6                                               | VII <sub>1</sub> -VII <sub>19</sub>     |
|                       |                |                                          |                                             |                                      |                                                   |                                         |

Fortsetzung Tabelle 9a

| Inkub.<br>dauer i.<br>Tagen | Inkubation<br>von               | Anzahl d.<br>zugesetz.<br>Phagen<br>$\times 10^9$ | Anzahl d.<br>plattiert.<br>Konidien<br>$\times 10^7$ | Anzahl d.<br>tryp <sup>+</sup> -<br>Kolonien | Rate d.<br>tryp <sup>+</sup> -<br>Kolon.<br>$\times 10^{-7}$ | Bezeichn.<br>d. tryp <sup>+</sup> -<br>Kolonien                           |
|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 2                           | tryp-1, his-1/<br>tryp-1, his-5 | 2<br>2                                            | 12<br>12                                             | 14<br>17                                     | 1,2<br>1,4                                                   | IV <sub>1</sub> -IV <sub>14</sub><br>X <sub>1</sub> -X <sub>17</sub>      |
| 3                           | Heterokaryen                    | 2<br>2                                            | 12<br>12                                             | 10<br>5                                      | 0,8<br>0,4                                                   | II <sub>1</sub> -II <sub>10</sub><br>VIII <sub>1</sub> -VIII <sub>5</sub> |

Anmerkung: Die erhaltenen tryp<sup>+</sup>-Kolonien waren gleichmäßig auf den Minimalplatten verteilt.

Tabelle 9b Zusammenstellung der erfolgreichen Versuche mit  $\lambda$  tryp-DNS.

| Inkub. dauer i. Tagen | Inkubation von | Inkubation mit | Menge d. zuges. DNS i. $\gamma$ | Anz. d. platt. Konidien $\times 10^7$ | Anz. d. trypt <sup>+</sup> -Kolon. | Rate d. trypt <sup>+</sup> -Kolon. $\times 10^{-7}$ | Bezeich. d. trypt <sup>+</sup> Kolon. |
|-----------------------|----------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1                     | fragment.      | lin. DNS       | 20                              | 10                                    | 2                                  | 0,2                                                 | DNS <sub>1</sub> -DNS <sub>2</sub>    |
|                       | tryp-1, his-1  |                |                                 |                                       |                                    |                                                     |                                       |
|                       | Mycel          | "Hershey c."   | 1                               | 10                                    | 1                                  | 0,1                                                 | H                                     |
|                       | Heterokar.     | lin. DNS       | 3                               | 5                                     | 1                                  | 0,2                                                 | B                                     |
|                       |                |                | 3                               | 25                                    | 86(+)                              | 3,4                                                 | X <sub>1</sub> -X <sub>86</sub>       |

(+) Die Kolonien waren gleichmäßig auf 50 Platten verteilt.

#### 4. Charakterisierung der tryptophanprototrophen Isolate.

Nach Behandlung von tryptophanauxotrophen Neurospora-zellen mit  $\lambda$ ptrp-Phagen bzw. deren DNS, wurden insgesamt 231  $\text{tryp}^+$ -Kolonien abisoliert (vgl. Tabellen 9a und 9b), 58 davon (bei Experimenten mit bis zu 5  $\text{tryp}^+$ -Kolonien alle, bei Experimenten mit mehr als 5  $\text{tryp}^+$ -Kolonien 3-5 davon) wurden näher untersucht.

##### 4.1. Prüfung der Stabilität der tryptophanprototrophen Isolate.

Um zu prüfen, ob die Tryptophanprototrophie der 58 ausgewählten Isolate über mehrere vegetative Passagen erhalten bleibt oder ob es sich dabei nur um einen Kurzzeiteffekt handelt, wurden von den Isolaten durch Überimpfen auf Neurospora-Culture-Agar-Röhrchen (vgl. B.44.4.) im zeitlichen Abstand von 3 Tagen, jeweils 10 Subkulturen angelegt. Jede dieser Subkulturen wurde durch Beimpfen von flüssigem Sucrose-minimalmedium +/- Tryptophan qualitativ auf ihre Tryptophanprototrophie hin getestet (vgl. B.44.5.1.). Es zeigte sich, daß 20 der 58 untersuchten Isolate im Laufe der vegetativen Subkultivierung tryptophanbedürftig wurden und zwar 4 Isolate bereits in der 1., 5 in der 2., 8 in der 3., 2 in der 5. und 1 in der 6. Subkultur (vgl. Tabelle 10). Die übrigen Isolate blieben bis zur letzten (10.) untersuchten Subkultur tryptophanprototroph.

##### 4.2. Genetische Analyse der instabilen Isolate.

Der Verlust der Tryptophanprototrophie während der vegetativen Subkultivierung bei 20 Isolaten (vgl. Tabelle 10) deutet darauf hin, daß der prototrophiebedingende Marker nicht in das Neurosporagenom in-

Tabelle 10 Zusammenstellung der während der vegetativen Vermehrung instabilen tryp<sup>+</sup>-Isolate.

| Subkultur<br>→<br>Isolat ↓ | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| X <sub>1</sub>             | + | - | - |   |   |   |   |
| X <sub>4</sub>             | + | - | - |   |   |   |   |
| VIII <sub>2</sub>          | + | - | - |   |   |   |   |
| VIII <sub>4</sub>          | + | - | - |   |   |   |   |
| R <sub>19</sub>            | + | + | - | - |   |   |   |
| V <sub>1</sub>             | + | + | - | - |   |   |   |
| V <sub>3</sub>             | + | + | - | - |   |   |   |
| IV <sub>1</sub>            | + | + | - | - |   |   |   |
| IV <sub>3</sub>            | + | + | - | - |   |   |   |
| IV <sub>4</sub>            | + | + | + | - | - |   |   |
| IV <sub>5</sub>            | + | + | + | - | - |   |   |
| X <sub>2</sub>             | + | + | + | - | - |   |   |
| X <sub>3</sub>             | + | + | + | - | - |   |   |
| X <sub>5</sub>             | + | + | + | - | - |   |   |
| VIII <sub>1</sub>          | + | + | + | - | - |   |   |
| VIII <sub>3</sub>          | + | + | + | - | - |   |   |
| VIII <sub>5</sub>          | + | + | + | - | - |   |   |
| V <sub>2</sub>             | + | + | + | + | + | - | - |
| IV <sub>2</sub>            | + | + | + | + | + | - | - |
| V <sub>4</sub>             | + | + | + | + | + | + | - |

Anmerkung: Subkultur 0 ist das auf Neurospora-Culture-Agar angezüchtete tryp<sup>+</sup>-Isolat.

+ = Wachstum auf Minimalmedium ohne Tryptophan;

- = Kein Wachstum auf Minimalmedium ohne Tryptophan

tegriert wurde. Es sollte nun geprüft werden, ob dieser möglicherweise extrachromosomal vorliegende Marker, bei Kreuzen der noch tryptophanprototrophen Ausgangsisolate (Subkultur 0) mit einem tryp-1 Stamm, auf die Ascosporen weitergegeben wird.

Dazu wurden 6 Isolate, die ihre tryp<sup>+</sup>-Eigenschaft in der 1., 2., 3., 5. bzw. 6. Subkultur verloren hatten, sowie zur Kontrolle der Wildtyp, mit einem tryp-1 Stamm (männlicher Partner) vom entgegengesetzten Paarungstyp gekreuzt (vgl. B.46.1.) und gleiche Mengen Ascosporen auf GFS-Minimalmedium +/- Tryptophan plattiert.

Tabelle 11 Kreuzung vegetativ instabiler tryp<sup>+</sup>-Isolate mit der Mutante tryp-1.

| Isolat            | tryp <sup>-</sup> ab<br>Subkultur | Anzahl der Kolonien auf |     |
|-------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----|
|                   |                                   | M + T                   | M   |
| VIII <sub>4</sub> | 1                                 | 149                     | 0   |
| V <sub>1</sub>    | 2                                 | 735                     | 0   |
| R <sub>19</sub>   | 2                                 | 204                     | 0   |
| X <sub>2</sub>    | 3                                 | 107                     | 0   |
| V <sub>2</sub>    | 5                                 | 854                     | 0   |
| V <sub>4</sub>    | 6                                 | 81                      | 0   |
| Wt                | -                                 | 623                     | 298 |

Anmerkung: M + T = GFS-Minimalmedium + 50  $\mu$ g Tryptophan/ml

M = GFS-Minimalmedium ohne Tryptophan

Im Bedarfsfall wurden die Medien mit 100  $\mu$ g Histidin/ml supplementiert.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt: Während bei Kreuzung des Wildtyps (Wt) mit dem tryp-1 Stamm ca. die Hälfte der Sporen auf Minimalmedium ohne Tryptophan auskeimte (4:4 Aufspaltung), wurden bei den gekreuz -

ten instabilen Isolaten keine  $\text{tryp}^+$ -Ascosporen gefunden. Dies könnte bedeuten, daß der die Tryptophanprototrophie bedingende Marker während des Kreuzungsvorganges eliminiert bzw. in den Ascosporen nicht exprimiert wurde.

#### 4.3. Differentielle Plattierung der stabilen tryptophan-prototrophen Isolate.

Die nach  $\lambda$ ptrp-Phagen bzw. -DNS Behandlung erhaltenen Kolonien sind auf phänotypisch tryptophanprototrophe Konidien zurückzuführen. Es ist nun denkbar, daß der  $\text{tryp}^+$ -Marker in den Konidien

- a) in allen Kernen integriert oder als Exosom,
  - b) in nur einem Kern integriert oder als Exosom und
  - c) als extrachromosomaler Faktor (=Plasmid) vorlag.
- In Fall a) sollten sich alle Zellen der Isolate als  $\text{tryp}^+$  erweisen (Homokaryon), in Fall b) nur ein Teil (Heterokaryon), in Fall c) sind beide Möglichkeiten denkbar.

Um zwischen Homokaryen und Heterokaryen unterscheiden zu können, wurden die Isolate auf Glycerol complete Medium angezüchtet und anschließend jeweils ca. 300 Konidien auf GFS-Minimalmedium +/- Tryptophan plattiert (vgl. B.44.6.). Dabei zeigte sich, daß bei 19 der 38 untersuchten Isolaten mit und ohne Tryptophan die gleiche Anzahl Konidien auskeimte. Diese Isolate wurden als homokaryotisch bezeichnet, obwohl nicht ausgeschlossen werden konnte, daß zumindest bei einigen Isolaten der  $\text{tryp}^+$ -Marker auf einem Plasmid lokalisiert sein kann (vgl. Tabelle 12a). Bei der anderen Hälfte der Isolate wurden auf GFS-Minimalmedium ohne Tryptophan 20-60% weniger Kolonien als auf Medium mit Tryptophan gefunden (vgl. Tabelle 12b). Auch bei diesen heterokaryotisch genannten Isolaten könnte der  $\text{tryp}^+$ -Marker auf einem Plasmid liegen.

Tabelle 12a

Zusammenstellung der homokaryotischen  
tryp<sup>+</sup>-Isolate.

| Isolat          | Anzahl der<br>Kolonien auf |     | Anzahl d.<br>tryp <sup>+</sup> -Kol.<br>in % | MW i.<br>% | +/-<br>2σ |
|-----------------|----------------------------|-----|----------------------------------------------|------------|-----------|
|                 | M+T                        | M   |                                              |            |           |
| A <sub>1</sub>  | 224                        | 213 | 95                                           | 92         | 7         |
|                 | 222                        | 195 | 88                                           |            |           |
| A <sub>2</sub>  | 211                        | 212 | 100                                          | -          | -         |
| A <sub>3</sub>  | 320                        | 311 | 97                                           | 100        | 6         |
|                 | 317                        | 329 | 103                                          |            |           |
| A <sub>4</sub>  | 194                        | 226 | 116                                          | 104        | 12,3      |
|                 | 258                        | 246 | 95                                           |            |           |
|                 | 480                        | 500 | 102                                          |            |           |
| E <sub>1</sub>  | 161                        | 155 | 96                                           | 94         | 4         |
|                 | 144                        | 138 | 96                                           |            |           |
|                 | 146                        | 132 | 90                                           |            |           |
| E <sub>2</sub>  | 218                        | 175 | 80                                           | 93         | 12,7      |
|                 | 275                        | 263 | 98                                           |            |           |
|                 | 318                        | 321 | 100                                          |            |           |
| E <sub>3</sub>  | 181                        | 210 | 116                                          | 106        | 20        |
|                 | 240                        | 230 | 96                                           |            |           |
| E <sub>4</sub>  | 295                        | 316 | 107                                          | 101        | 6,3       |
|                 | 227                        | 230 | 101                                          |            |           |
|                 | 161                        | 155 | 96                                           |            |           |
| T <sub>8</sub>  | 211                        | 204 | 97                                           | -          | -         |
| T <sub>9</sub>  | 248                        | 244 | 98                                           | -          | -         |
| R <sub>20</sub> | 243                        | 288 | 118                                          | 106        | 24        |
|                 | 424                        | 400 | 94                                           |            |           |
| R <sub>22</sub> | 180                        | 180 | 100                                          | -          | -         |
| x <sub>3</sub>  | 172                        | 158 | 92                                           | 95         | 5,1       |
|                 | 388                        | 375 | 97                                           |            |           |
| N               | 154                        | 164 | 106                                          | -          | -         |
| HS <sub>2</sub> | 202                        | 240 | 118                                          | 101        | 35        |
|                 | 274                        | 228 | 83                                           |            |           |
| HS <sub>6</sub> | 205                        | 220 | 107                                          | 97         | 21        |
|                 | 140                        | 121 | 86                                           |            |           |

Fortsetzung Tabelle 12a

| Isolat           | Anzahl der<br>Kolonien auf |     | Anzahl d.<br>tryp <sup>+</sup> -Kol.<br>in % | MW i.<br>% | +/-<br>2σ |
|------------------|----------------------------|-----|----------------------------------------------|------------|-----------|
|                  | M+T                        | M   |                                              |            |           |
| VII <sub>1</sub> | 196                        | 183 | 93                                           | 94         | 2         |
|                  | 197                        | 188 | 95                                           |            |           |
| VII <sub>4</sub> | 203                        | 214 | 105                                          | 96         | 17        |
|                  | 149                        | 131 | 88                                           |            |           |
| VII <sub>5</sub> | 146                        | 149 | 102                                          | 101        | 3,2       |
|                  | 225                        | 223 | 99                                           |            |           |

Tabelle 12b

Zusammenstellung der heterokaryotischen  
tryp<sup>+</sup>-Isolate.

| Isolat         | Anzahl der<br>Kolonien auf |     | Anzahl d.<br>tryp <sup>+</sup> -Kol.<br>in % | MW i.<br>% | +/-<br>2σ |
|----------------|----------------------------|-----|----------------------------------------------|------------|-----------|
|                | M+T                        | M   |                                              |            |           |
| A <sub>I</sub> | 407                        | 303 | 81                                           | 67         | 9,9       |
|                | 217                        | 144 | 66                                           |            |           |
|                | 330                        | 246 | 75                                           |            |           |
|                | 124                        | 79  | 64                                           |            |           |
| A <sub>5</sub> | 430                        | 300 | 70                                           | 75         | 13,5      |
|                | 222                        | 195 | 88                                           |            |           |
|                | 411                        | 270 | 66                                           |            |           |
| x <sub>1</sub> | 296                        | 178 | 60                                           | 54         | 12        |
|                | 165                        | 79  | 48                                           |            |           |
| x <sub>2</sub> | 296                        | 177 | 60                                           | 70         | 19        |
|                | 154                        | 121 | 79                                           |            |           |
| x <sub>4</sub> | 165                        | 52  | 32                                           | 41         | 22,5      |
|                | 243                        | 154 | 63                                           |            |           |
|                | 330                        | 89  | 27                                           |            |           |
| x <sub>5</sub> | 230                        | 195 | 85                                           | 85         | 1,4       |
|                | 243                        | 196 | 84                                           |            |           |
| HS             | 244                        | 207 | 85                                           | 79         | 13        |
|                | 395                        | 284 | 72                                           |            |           |

Fortsetzung Tabelle 12b

| Isolat           | Anzahl der<br>Kolonien auf |     | Anzahl d.<br>tryp <sup>+</sup> -Kol.<br>in % | MW i.<br>% | +/-<br>26 |
|------------------|----------------------------|-----|----------------------------------------------|------------|-----------|
|                  | M+T                        | M   |                                              |            |           |
| HS <sub>1</sub>  | 462                        | 299 | 65                                           | 72         | 14        |
|                  | 219                        | 173 | 79                                           |            |           |
| HS <sub>3</sub>  | 252                        | 114 | 45                                           | 43         | 4         |
|                  | 250                        | 103 | 41                                           |            |           |
| HS <sub>5</sub>  | 232                        | 177 | 76                                           | 56         | 41        |
|                  | 72                         | 25  | 35                                           |            |           |
| HS <sub>7</sub>  | 180                        | 159 | 88                                           | 73         | 30        |
|                  | 192                        | 111 | 58                                           |            |           |
| B                | 193                        | 148 | 77                                           | 62         | 12        |
|                  | 182                        | 107 | 59                                           |            |           |
|                  | 173                        | 83  | 48                                           |            |           |
|                  | 248                        | 158 | 64                                           |            |           |
| DNS <sub>1</sub> | 616                        | 192 | 31                                           | -          | -         |
| DNS <sub>2</sub> | 224                        | 72  | 32                                           | -          | -         |
| H                | 114                        | 6   | 5                                            | -          | -         |
| T <sub>3</sub>   | 334                        | 280 | 84                                           | 85         | 2         |
|                  | 327                        | 282 | 86                                           |            |           |
| T <sub>4</sub>   | 219                        | 194 | 88                                           | 87         | 2         |
|                  | 233                        | 202 | 86                                           |            |           |
| T <sub>5</sub>   | 265                        | 233 | 88                                           | -          | -         |
|                  | 321                        | 253 | 79                                           |            |           |
| R <sub>43</sub>  | 220                        | 211 | 96                                           | 84         | 7,8       |
|                  | 186                        | 148 | 80                                           |            |           |
|                  | 362                        | 300 | 84                                           |            |           |

Anmerkungen zu den Tabellen 12a und 12b:

M+T = GFS-Minimalmedium + 50  $\mu$ g Tryptophan /ml,

M = GFS-Minimalmedium ohne Tryptophan.

Die Medien wurden im Bedarfsfall mit 100  $\mu$ g Histidin/ml supplementiert.

Die angegebenen Mittelwerte wurden aus 2-4 unabhängig von einander durchgeführten Versuchen errechnet.

#### 4.4. Prüfung der Tryptophanprototrophie in den vegetativen Subkulturen.

Bei 3 heterokaryotischen Isolaten, DNS<sub>1</sub>, DNS<sub>2</sub> und H (vgl. Tabelle 12b) wurde geprüft, ob sich der Anteil der tryp<sup>+</sup>-Zellen im Verlauf von 10 vegetativen Passagen verändert, d.h., eine positive bzw. negative Selektion des Tryptophanprototrophie bedingenden Markers stattfindet.

Tabelle 13      Stabilität der Tryptophanprototrophie in den vegetativen Subkulturen dreier heterokaryotischer Isolate.

| Subkultur<br>→   |                                      |     | 0   | 2   | 4   | 6   | 8   | 10  |
|------------------|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Isolat<br>↓      |                                      |     |     |     |     |     |     |     |
| DNS <sub>1</sub> | Anzahl der                           | M+T | 616 | 125 | 258 | 215 | 259 | 309 |
|                  | Kolon.auf                            | M   | 192 | 30  | 98  | 84  | 127 | 135 |
|                  | Anzahl der tryp <sup>+</sup> Kol.i.% |     | 31  | 24  | 38  | 39  | 49  | 44  |
| DNS <sub>2</sub> | Anzahl der                           | M+T | 224 | 255 | 266 | 244 | 309 | 326 |
|                  | Kolon.auf                            | M   | 72  | 107 | 122 | 107 | 189 | 181 |
|                  | Anzahl der tryp <sup>+</sup> Kol.i.% |     | 32  | 42  | 46  | 47  | 61  | 56  |
| H                | Anzahl der                           | M+T | 114 | 108 | 82  | 134 | 300 | 250 |
|                  | Kolon.auf                            | M   | 6   | 10  | 13  | 24  | 36  | 11  |
|                  | Anzahl der tryp <sup>+</sup> Kol.i.% |     | 5   | 9   | 16  | 18  | 12  | 4   |

Anmerkung: M + T = GFS-Minimalmedium + 100 µg Histidin/ml + 50 µg Tryptophan/ml;  
M = GFS-Minimalmedium + 100 µg Histidin/ml.

Dazu wurden die 3 Ausgangsisolate ( = Subkulturen 0 ), so wie ihre Subkulturen 2,4,6,8 und 10, jeweils auf Glycerol complete Medium angezüchtet und anschließend gleiche Mengen Konidien auf GFS-Minimalmedium +/- Tryptophan plattiert (vgl. B.44.5.2.).

Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 13 aufgeführt. Es zeigte sich, daß bei allen 3 Isolaten die Rate der  $\text{tryp}^+$ -Kolonien in den untersuchten Subkulturen in etwa gleichbleibend war: Ca. 30-50% bei Isolat  $\text{DNS}_1$ , ca. 30-60% bei Isolat  $\text{DNS}_2$  und ca. 5-20% bei Isolat H.

#### 4.5. Einfluß von Tryptophan im Anzuchtmedium auf die Rate der $\text{tryp}^+$ -Zellen bei heterokaryotischen Isolaten.

Bei den 3 unter 4.4. angeführten Isolaten (  $\text{DNS}_1$ ,  $\text{DNS}_2$  und H ) wurde untersucht, ob die Anwesenheit von Tryptophan im Anzuchtmedium einen Einfluß auf den Anteil der  $\text{tryp}^+$ -Zellen ausübt.

Dazu wurden die Ausgangsisolate (Subkulturen 0) jeweils auf Glycerol complete Medium +/- Tryptophan angezüchtet und anschließend jeweils gleiche Mengen Konidien auf GFS-Minimalmedium +/- Tryptophan plattiert (vgl. B. 45.).

Wie aus Tabelle 14 zu ersehen ist, unterscheidet sich die Rate der  $\text{tryp}^+$ -Zellen, angezüchtet auf Medium mit Tryptophan, nicht signifikant von der Rate der auf Medium ohne Tryptophan angezüchteten  $\text{tryp}^+$ -Zellen.

#### 4.6. Genetische Analyse der stabilen tryptophanprototrophen Isolate.

Die nach  $\lambda_{\text{ptrip}}$ -Phagen bzw. -DNS Behandlung erhaltenen stabilen  $\text{tryp}^+$ -Isolate waren zum Teil heterokaryotischer zum Teil homokaryotischer Natur (vgl. Tabellen 12a und b). Wie bereits in 4.4. erwähnt, konnten jedoch noch keine Aussagen darüber gemacht werden, ob der  $\text{tryp}^+$ -bedingende Mar-

Tabelle 14

Einfluß von Tryptophan im Anzuchtmedium  
auf den Anteil tryptophanprototropher  
Konidien bei heterokaryotischen tryp<sup>+</sup>  
Isolaten.

|                                  |                         | Isolat | DNS <sub>1</sub> | DNS <sub>2</sub> | H   |
|----------------------------------|-------------------------|--------|------------------|------------------|-----|
| <u>Anzucht-</u><br><u>medium</u> |                         |        |                  |                  |     |
| -<br>Tryptophan                  | M + T                   |        | 402              | 458              | 265 |
|                                  |                         |        | 313              | 265              | 237 |
|                                  | M                       |        | 164              | 258              | 15  |
|                                  |                         |        | 108              | 124              | 16  |
|                                  | tryp <sup>+</sup> -Kol. |        | 41               | 56               | 5   |
|                                  | in %                    |        | 34               | 47               | 7   |
|                                  | Mittelwert              |        |                  |                  |     |
|                                  | in %                    |        | 38               | 52               | 6   |
|                                  | +/- 2 σ                 |        | 7                | 9                | 2   |
|                                  |                         |        |                  |                  |     |
| +<br>Tryptophan                  | M + T                   |        | 344              | 454              | 318 |
|                                  |                         |        | 266              | 265              | 208 |
|                                  | M                       |        | 136              | 207              | 6   |
|                                  |                         |        | 85               | 85               | 8   |
|                                  | tryp <sup>+</sup> -Kol. |        | 40               | 46               | 2   |
|                                  | in %                    |        | 33               | 33               | 4   |
|                                  | Mittelwert              |        |                  |                  |     |
|                                  | in %                    |        | 37               | 40               | 3   |
|                                  | +/- 2 σ                 |        | 7                | 13               | 2   |
|                                  |                         |        |                  |                  |     |

Anmerkung: M + T = GFS-Minimalmedium + 50 γTryptophan/  
ml + 100 γHistidin/ml;

M = GFS-Minimalmedium + 100 γHistidin/ml.

Die angegebenen Mittelwerte wurden aus 2 unabhängig von  
einander durchgeführten Versuchen ermittelt.

ker der 38 untersuchten Isolate in den Kernen integriert, als Exosom oder als Plasmid vorhanden war. Kreuzungen der Isolate mit der Mutante tryp-1 sollten darüber, Kreuzungen mit dem Wildtyp über die Lokalisation des tryp<sup>+</sup>-Markers Aufschluß geben.

#### 4.6.1. Kreuzungen der stabilen tryp<sup>+</sup>-Isolate mit der Mutante tryp-1.

Dazu war es zunächst nötig, reine Linien der heterokaryotischen Isolate zu erstellen, da diese in jedem Fall eine anormale Aufspaltung bezüglich der Tryptophanprototrophie zeigen würden, während die Histidinauxotrophie, die in den Isolaten DNS<sub>1</sub>, DNS<sub>2</sub> und H vorliegt, Mendelsch vererbt werden sollte. Wie aus Tabelle 15 zu ersehen ist, ist dies tatsächlich der Fall.

Tabelle 15 Kreuzung dreier heterokaryotischer Isolate mit der Mutante tryp-1.

| Isolat           | Anzahl der Kolonien auf |     |     |                                 |                                |
|------------------|-------------------------|-----|-----|---------------------------------|--------------------------------|
|                  | M+T+H                   | M+H | M+T | tryp <sup>+</sup> -Kol.<br>in % | his <sup>+</sup> -Kol.<br>in % |
| DNS <sub>1</sub> | 743                     | 88  | 361 | 12                              | 49                             |
| DNS <sub>2</sub> | 517                     | 65  | 267 | 12                              | 51                             |
| H                | 590                     | 30  | 301 | 5                               | 51                             |

Anmerkung: M+T+H = GFS-Minimalmedium + 50  $\gamma$  Tryptophan/ml + 100  $\gamma$  Histidin/ml;

M+H = GFS-Minimalmedium + 100  $\gamma$  Histidin /ml;

M+T = GFS-Minimalmedium + 50  $\gamma$  Tryptophan/ml.

Reine Linien der heterokaryotischen Isolate wurden erhalten, indem diese jeweils mit der Mutante tryp-1 gekreuzt wurden (vgl. B.46.3.) und die reifen Ascosporen auf Minimalmedium ohne Tryptophan ausplattiert wurden (vgl. B.13.). Nach 3 Tagen wurden einzelne Kolonien von

den Platten auf Neurospora-culture-Agar-Röhrchen ab - isoliert und der Paarungstyp durch Kreuzen mit Wildtyp A und a bestimmt( F<sub>1</sub>-Isolate).Bei einigen Kreuzungen wurden ferner die tryp<sup>+</sup>-F<sub>1</sub>-Isolate durch Einzelsporen-isolierung(vgl.B.46.3.)erhalten.

Die homokaryotischen tryp<sup>+</sup>-Isolate,sowie die tryp<sup>+</sup>-F<sub>1</sub>-Isolate wurden nun mit der Mutante tryp-1 gekreuzt (vgl.B 46.2.und 46.5.),wobei die tryp<sup>+</sup>-Isolate als protoperitheciobildende Partner benutzt wurden. Die Rate der tryp<sup>+</sup>-Sporen wurde durch differentielle Plattierungen der Asco-sporen auf GFS-Minimalmedium +/- Tryptophan bestimmt.Um die Genauigkeit dieser "random Sporenanalyse" zu prüfen wurden Kontrollplattierungen mit Sporen aus der Kreuzung Wildtyp x tryp-1 durchgeführt.

Tabelle 16a

Kreuzung der tryp<sup>+</sup>-Isolate mit der Mutante tryp-1.

(Mendelsch aufspaltende Isolate).

| Isolat                        | Anzahl der Kolo-<br>nien auf M + T<br>(=A) | tryp <sup>+</sup> -Sporen<br>in %, bez. a.<br>A = 100% |
|-------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| A <sub>2</sub>                | 441                                        | 47                                                     |
| A <sub>3</sub>                | 302                                        | 55                                                     |
| E <sub>2</sub>                | 1209                                       | 50                                                     |
| T <sub>8</sub>                | 1294                                       | 45                                                     |
| VII <sub>1</sub>              | 81                                         | 51                                                     |
| R <sub>20</sub>               | 625                                        | 51                                                     |
| R <sub>22</sub>               | 155                                        | 45                                                     |
| x <sub>3</sub>                | 189                                        | 48                                                     |
| N                             | 712                                        | 53                                                     |
| HS <sub>2</sub>               | 100                                        | 51                                                     |
| F <sub>1</sub> T <sub>5</sub> | 102                                        | 49                                                     |
| F <sub>1</sub> A <sub>I</sub> | 504                                        | 51                                                     |
| F <sub>1</sub> A <sub>5</sub> | 1178                                       | 49                                                     |

Fortsetzung Tabelle 16a

| Isolat                          | Anzahl der Kolo-<br>nien auf M + T<br>(=A) | tryp <sup>+</sup> -Sporen<br>in %, bez. a.<br>A = 100% |
|---------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| F <sub>1</sub> x <sub>1</sub>   | 606                                        | 48                                                     |
| F <sub>1</sub> x <sub>2</sub>   | 419                                        | 52                                                     |
| F <sub>1</sub> x <sub>4</sub>   | 232                                        | 49                                                     |
| F <sub>1</sub> x <sub>5</sub>   | 186                                        | 50                                                     |
| F <sub>1</sub> HS               | 275                                        | 50                                                     |
| F <sub>1</sub> HS <sub>1</sub>  | 150                                        | 53                                                     |
| F <sub>1</sub> HS <sub>7</sub>  | 267                                        | 48                                                     |
| F <sub>1</sub> B                | 500                                        | 48                                                     |
| F <sub>1</sub> H                | 238                                        | 56                                                     |
| F <sub>1</sub> DNS <sub>1</sub> | 400                                        | 52                                                     |
| F <sub>1</sub> DNS <sub>2</sub> | 714                                        | 51                                                     |
| F <sub>1</sub> R <sub>43</sub>  | 1329                                       | 47                                                     |
| F <sub>1</sub> T <sub>3</sub>   | 190                                        | 52                                                     |
| F <sub>1</sub> T <sub>4</sub>   | 630                                        | 54                                                     |
| Wt                              | 623                                        | 48                                                     |

Anmerkung: M+T = GFS-Minimalmedium + 50  $\gamma$  Tryptophan/ml,  
im Bedarfsfall supplementiert mit 100  $\gamma$  His-  
tidin/ml.

In den Tabellen 16a und 16b sind die Ergebnisse zusammen-  
gestellt. Es zeigte sich, daß 10 der 19 gekreuzten homo-  
karyotischen tryp<sup>+</sup>-Isolate und 17 der 19 tryp<sup>+</sup>-F<sub>1</sub>-Isolate,  
ebenso wie der Wildtyp, eine Mendelsche Aufspaltung be-  
züglich des tryp<sup>+</sup>-Markers aufwiesen (Tab. 16a). Ca. 50%  
(45-56%) der Sporen waren tryptophanprototroph. Dies deu-  
tet auf eine Integration des Markers hin, der die Proto-  
trophie bedingt.

Während die Kreuzungen der Isolate F<sub>1</sub>HS<sub>3</sub> und F<sub>1</sub>HS<sub>5</sub> ste-  
ril waren, wurde bei den restlichen Isolaten eine aber-  
rante Transmission des tryp<sup>+</sup>-Markers beobachtet (vgl.  
Tab. 16b). Dabei war die Rate der tryp<sup>+</sup>-Sporen bei den

Isolaten A<sub>4</sub>, HS<sub>6</sub> und VII<sub>5</sub> kleiner als ca. 50%, bei den Isolaten A<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub>, VII<sub>4</sub> und T<sub>9</sub> größer. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die tryp<sup>+</sup>-Information entweder in Form eines Exosoms, das während der Meiose in einigen Fällen eliminiert wurde, oder als Plasmid in den Zellen vorlag.

Tabelle 16b

Kreuzung der tryp<sup>+</sup>-Isolate mit der Mutante tryp<sup>-</sup>1.  
(nicht Mendelsch aufspaltende Isolate).

| Isolat           | Anzahl der Kolo-<br>nien auf M + T<br>(=A) | tryp <sup>+</sup> -Sporen<br>in %, bez.a.<br>A = 100% |
|------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| A <sub>1</sub>   | 441                                        | 68                                                    |
| E <sub>1</sub>   | 320                                        | 98                                                    |
| E <sub>3</sub>   | 1262                                       | 72                                                    |
| E <sub>4</sub>   | 1434                                       | 73                                                    |
| VII <sub>4</sub> | 478                                        | 67                                                    |
| T <sub>9</sub>   | 367                                        | 92                                                    |
| A <sub>4</sub>   | 247                                        | 38                                                    |
| HS <sub>6</sub>  | 596                                        | 10                                                    |
| VII <sub>5</sub> | 256                                        | 30                                                    |

Anmerkung: M + T = GFS-Minimalmedium + 50  $\mu$ g Tryptophan/ml

4.6.2. Reziproke Kreuzung der nicht Mendelsch aufspaltenden trypt<sup>+</sup>-Isolate.

Um zu prüfen, ob bei den 9 Isolaten, die in Tabelle 16b aufgeführt sind, die anormale Aufspaltung bezüglich des die Tryptophanprototrophie bedingenden Markers durch dessen Lokalisation auf einem extrachromosomalen Faktor verursacht wird, wurden die betreffenden Isolate, sowie zur Kontrolle der Wildtyp, reziprok mit der Mutante trypt-1 (protoperithecienbildender Partner) gekreuzt (vgl. B.46.2.) und die Ascosporen differentiell auf GFS-Minimalmedium +/- Tryptophan plattiert (vgl. B.13.).

Tabelle 17 Reziproke Kreuzung der nicht Mendelsch aufspaltenden trypt<sup>+</sup>-Isolate mit der Mutante trypt-1.

| Isolat           | Anzahl der Kolonien auf |     |
|------------------|-------------------------|-----|
|                  | M+T                     | M   |
| A <sub>1</sub>   | 320                     | 0   |
| A <sub>4</sub>   | 550                     | 0   |
| E <sub>1</sub>   | 291                     | 0   |
| E <sub>3</sub>   | 389                     | 0   |
| E <sub>4</sub>   | 129                     | 0   |
| HS <sub>6</sub>  | 71                      | 0   |
| VII <sub>4</sub> | 216                     | 78  |
| VII <sub>5</sub> | 135                     | 0   |
| T <sub>9</sub>   | 82                      | 0   |
| Wt               | 311                     | 159 |

Anmerkung: M + T = GFS-Minimalmedium + 50  $\mu$ g Tryptophan/ml  
M = GFS-Minimalmedium ohne Tryptophan.

Wie aus Tabelle 17 zu ersehen ist, waren, wie erwartet, ca. 50% der Sporen aus der Kontrollkreuzung  $\text{tryp-1} \times$  Wildtyp tryptophanprototroph, während bei 8 der 9 reziprok gekreuzten Isolate keine  $\text{tryp}^+$ -Sporen gefunden wurden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß der die Tryptophanprototrophie bedingende Marker auf einem Plasmid liegt und deshalb nur bei Verwendung der Isolate als weiblicher Kreuzungspartner in den Ascosporen auftritt. Bei der Kreuzung  $\text{tryp-1} \times$  Isolat VII<sub>4</sub> erwiesen sich ca. 1/3 der Sporen als tryptophanprototroph. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß der  $\text{tryp}^+$ -Marker als Exosom in den Zellen vorlag und beim Kreuzungsvorgang zum Teil eliminiert wurde.

#### 4.6.3. Kreuzung der Mendelsch aufspaltenden $\text{tryp}^+$ -Isolate mit dem Wildtyp.

Um zu prüfen, ob der die Tryptophanprototrophie bedingende Marker der Mendelsch aufspaltenden  $\text{tryp}^+$ -Isolate auf Kopplungsgruppe III (=Kopplungsgruppe des  $\text{tryp-1}$  Markers) lokalisiert ist, wurden die entsprechenden Isolate (vgl. Tabelle 16a), sowie die beiden Isolate F<sub>1</sub>HS<sub>3</sub> und F<sub>1</sub>HS<sub>5</sub>, die sich bei der Kreuzung mit der Mutante  $\text{tryp-1}$  als steril erwiesen hatten (vgl. 4.6.1.), mit dem Wildtyp des entgegengesetzten Paarungstyps gekreuzt. Zur Kontrolle wurde ferner die Kreuzung Wt A  $\times$  Wt a durchgeführt. Die reifen Ascosporen wurden anschließend auf GFS-Minimalmedium +/- Tryptophan plattiert (vgl. B.46.2.b).

Es zeigte sich, daß bei 22 von den 29 untersuchten Isolaten, sowie bei der Wildtypkontrolle, auf GFS-Minimalmedium mit und ohne Tryptophan etwa die gleiche Anzahl an Ascosporen auskeimt (vgl. Tabelle 18a). Dies ist ein Hinweis darauf, daß sich der die Prototrophie bedingende Marker an der dem  $\text{tryp-1}$  Marker homologen Stelle

Tabelle 18a Kreuzung der Mendelsch aufspaltenden  
tryp<sup>+</sup>-Isolate mit dem Wildtyp (tryp<sup>+</sup>-  
Marker auf Kopplungsgruppe III).

| Isolat                          | Anzahl der Kolonien auf |      | tryp <sup>+</sup> -Kol.<br>in % |
|---------------------------------|-------------------------|------|---------------------------------|
|                                 | M+T                     | M    |                                 |
| A <sub>2</sub>                  | 854                     | 831  | 97                              |
| A <sub>3</sub>                  | 290                     | 291  | 100                             |
| E <sub>2</sub>                  | 538                     | 527  | 96                              |
| T <sub>8</sub>                  | 389                     | 379  | 97                              |
| VII <sub>1</sub>                | 520                     | 550  | 106                             |
| R <sub>20</sub>                 | 1105                    | 1097 | 100                             |
| R <sub>22</sub>                 | 187                     | 181  | 97                              |
| N                               | 217                     | 220  | 101                             |
| HS <sub>2</sub>                 | 357                     | 349  | 98                              |
| F <sub>1</sub> T <sub>5</sub>   | 718                     | 725  | 101                             |
| F <sub>1</sub> A <sub>I</sub>   | 300                     | 309  | 103                             |
| F <sub>1</sub> A <sub>5</sub>   | 237                     | 231  | 97                              |
| F <sub>1</sub> x <sub>1</sub>   | 147                     | 154  | 105                             |
| F <sub>1</sub> x <sub>2</sub>   | 422                     | 417  | 99                              |
| F <sub>1</sub> x <sub>4</sub>   | 80                      | 74   | 93                              |
| F <sub>1</sub> HS <sub>1</sub>  | 146                     | 143  | 99                              |
| F <sub>1</sub> HS <sub>5</sub>  | 238                     | 249  | 105                             |
| F <sub>1</sub> HS <sub>7</sub>  | 128                     | 121  | 95                              |
| F <sub>1</sub> B                | 347                     | 360  | 104                             |
| F <sub>1</sub> H                | 112                     | 111  | 100                             |
| F <sub>1</sub> DNS <sub>2</sub> | 489                     | 503  | 103                             |
| F <sub>1</sub> T <sub>3</sub>   | 611                     | 604  | 99                              |
| Wt                              | 193                     | 201  | 104                             |

Anmerkung: M+T = GFS-Minimalmedium + 50 µg Tryptophan/ml  
M = GFS-Minimalmedium ohne Tryptophan.

oder dieser nahe benachbart befindet. Lage der  $\text{tryp}^+$ -Marker nicht auf Kopplungsgruppe III bzw. auf Kopplungsgruppe III aber in großem Abstand vom  $\text{tryp}^-$  Marker, so wären tryptophanauxotrophe Rekombinanten zu erwarten. Dies war bei den Isolaten  $x_3$ ,  $x_5$ ,  $T_4$ ,  $R_{43}$ , HS und  $\text{DNS}_1$  der Fall. Hier wuchsen auf GFS-Minimal-Medium ohne Tryptophan ca. 20-30 % weniger Sporen als auf supplementiertem Medium, d.h. ca. 20-30 % der Sporen waren Tryptophan-auxotroph (Tabelle 18b).

Bei der Kreuzung  $F_1$  HS<sub>3</sub> x Wildtyp wurden keine Perithezien mit Ascosporen gefunden. Die Kreuzung war steril.

Tabelle 18b

Kreuzung der Mendelsch aufspaltenden  $\text{tryp}^+$ -Isolate mit dem Wildtyp (  $\text{tryp}^+$ -Marker nicht auf Kopplungsgruppe III ).

| Isolat         | Anzahl der Kolonien auf |     | $\text{tryp}^+$ -Kol. in % | MW i. % | +/- 2 |
|----------------|-------------------------|-----|----------------------------|---------|-------|
|                | M+T                     | M   |                            |         |       |
| $x_3$          | 182                     | 155 | 85                         | 81      | 8     |
|                | 403                     | 310 | 77                         |         |       |
| $x_5$          | 200                     | 136 | 68                         | 75      | 13    |
|                | 371                     | 300 | 81                         |         |       |
| $T_4$          | 307                     | 241 | 78                         | 73      | 11    |
|                | 146                     | 98  | 67                         |         |       |
| $R_{43}$       | 286                     | 188 | 66                         | -       | -     |
| HS             | 335                     | 254 | 76                         | 79      | 5,1   |
|                | 418                     | 335 | 81                         |         |       |
| $\text{DNS}_1$ | 451                     | 313 | 69                         | 71      | 4     |

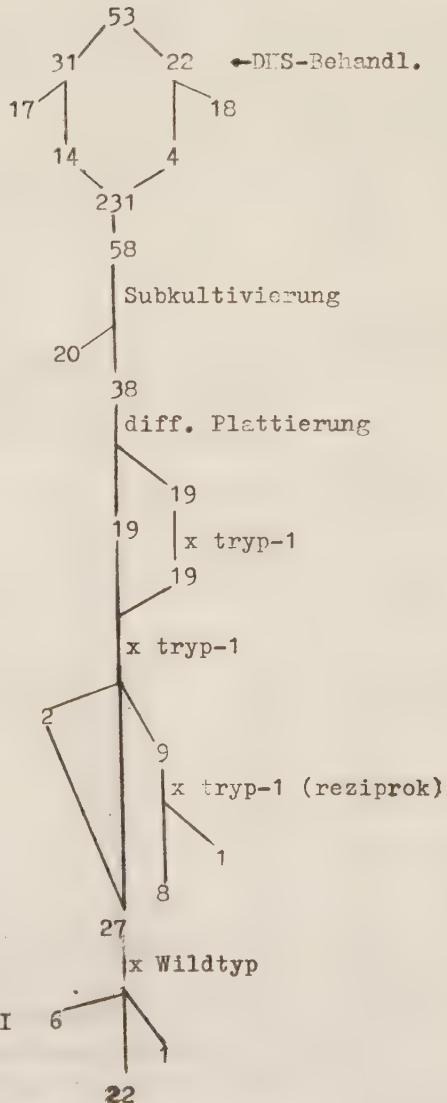
Anmerkung: M + T = GFS-Minimal-Medium + 50  $\mu$ g Tryptophan /ml  
M = GFS-Minimalmedium ohne Tryptophan.

Die Mittelwerte wurden aus 2 unabhängig von einander durchgeführten Versuchen errechnet.

4.7. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen  
zur Expression bakterieller Erbinformation in  
Neurospora crassa.

Experimente

Phagenbehandlung →  
nicht erfolg. Exp.  
erfolgreiche Exp.  
tryp<sup>+</sup>-Kol. insges.  
tryp<sup>+</sup>-Kol. unters.



instabile Isolate  
stabile Isolate  
heterokaryot. Isol.  
homokaryot. Isolate  
homokaryot. F<sub>1</sub>

steril  
anormale Aufspalt.

anormale Aufspalt.  
0 : 8 Aufspaltung  
Mendel. Aufspalt.

tryp<sup>+</sup> n.a. Koppl. III  
steril  
tryp<sup>+</sup> a. Koppl. III

5. Bestimmung der Keimungsrate von Wildtypkonidien  
nach Behandlung von Wildtypmycel mit  $\lambda$ ptrp-Phagen.

Es ist denkbar, daß Prokaryonten-DNS in Neurospora-zellen neben dem gewünschten "spezifischen Effekt" (Heilung von Auxotrophien) auch einen "unspezifischen" ausübt, sei es durch willkürliche Integration der DNS bzw. ihrer Bruchstücke in das Neurospora-genom (Mutatorwirkung) oder sei es durch die Bildung von für Neurospora toxischen Phagengenprodukten.

Um einen möglichen "unspezifischen Effekt" zu prüfen, wurden fragmentierte Neurospora-Wildtypmycelien 1 Tag mit  $\lambda$ ptrp-Phagen, Konz. ca.  $1 \times 10^{10}$ , inkubiert, 6-8 Wochen auf Glycerol complete Medium weitergezüchtet, anschließend die Konidien geerntet und auf GFS-Minimalmedium plattiert (vgl. B.47.). Zur Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit TMG-Puffer, an Stelle von Phagen, durchgeführt.

Aus Tabelle 19 ist zu ersehen, daß die Keimungsrate der Konidien bei der Pufferkontrolle ca. 50%, bei den Konidien von phagenbehandeltem Mycel dagegen nur ca. 15% beträgt. Dies bedeutet, daß von letzteren, in Bezug auf die Kontrolle, ca. 70% nicht keimungsfähig sind. Die relativ niedrige Keimungsrate der Kontrolle könnte durch das Alter der Konidien bedingt sein. Die deutliche Verminderung der Keimungsrate bei phagenbehandelten Konidien deutet darauf hin, daß Prokaryonten-DNS in Neurospora auch " unspezifisch " wirksam ist.

Tabelle 19

Einfluß von  $\lambda$ ptrp-Phagen auf die Keimungsrate von Neurospora-Wildtyp-  
konidien.

| Experi-<br>ment | Kontrolle:                                                             |      |              |              |  |                                                              |      |              |                             |                |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------|------|--------------|--------------|--|--------------------------------------------------------------|------|--------------|-----------------------------|----------------|
|                 | Konidien von $\lambda$ ptrp-<br>Phagen behandeltem<br>Wildtypmycel (A) |      |              |              |  | Konidien von TMG-Puffer<br>behandeltem Wildtyp-<br>mycel (B) |      |              |                             |                |
|                 | platt.                                                                 | gef. | K.R.<br>i. % | K.R.<br>i. % |  | platt.                                                       | gef. | K.R.<br>i. % | A i. %. bez.<br>a. B = 100% | MW i. %<br>+/- |
| 1               | 1725                                                                   | 391  | 18           | 18           |  | 1700                                                         | 917  | 54           | 33                          |                |
| 2               | 1600                                                                   | 222  | 14           | 14           |  | 1700                                                         | 783  | 46           | 30                          | 33             |
| 3               | 5900                                                                   | 1360 | 23           | 23           |  | 5800                                                         | 3011 | 51           | 45                          | 8,8            |
| 4               | 1350                                                                   | 150  | 11           | 11           |  | 900                                                          | 412  | 46           | 24                          |                |

Anmerkung: K.R. = Keimungsrate

Der Mittelwert (MW) wurde aus 4 unabhängig von einander durchgeführten Versuchen  
errechnet.

#### D. DISKUSSION.

In der vorliegenden Arbeit sollte an dem Modellsystem - *Neurospora crassa* / transduzierender Phagen - geprüft werden, ob eine phänotypische Expression prokaryotischer Erbinformation in einem eukaryotischen Zellmilieu stattfinden kann.

Zunächst mußte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglichte, Phagenpartikel in die für sie unspezifischen Pilzzellen einzuschleusen. Das Problem, das sich dabei stellte, war die Umgehung der für Partikel von Phagengröße nicht permeablen Barriere Zellwand. Das Problem konnte gelöst werden, indem die Phagen während der Heterokaryonbildung, der Verschmelzung verschiedener Stämme gleichen Paarungstyps, zugesetzt wurden. Vermutlich konnten die Phagen durch die im Fusionsbereich entstandenen Zellwandöffnungen eindringen.

Es zeigte sich, daß nach 1 tägiger Inkubation heterokaryotischer *tryp-1*, *his-1A/tryp-1*, *his-5A* Zellen mit  $\lambda$ pt<sub>trp</sub>-Phagen ca. 0,01% - 0,002%, nach 2 tägiger Inkubation ca. 0,05% - 0,01% der aktiven Phagen, die dem Inkubationsmedium zugesetzt worden waren, mit den Pilzzellen assoziiert waren. Von diesen, mittels eines Bakterienindikatorstammes als "plaque forming units" (p.f.u.) nachgewiesenen Phagenpartikeln, konnten jedoch durch Andauen der *Neurospora*-Zellwand mit dem Schnekenenzym Glucuronidase ca. 25% (1 tägige Inkubation) bzw. ca. 40% (2 tägige Inkubation) entfernt werden. Vermutlich handelte es sich bei diesen abgelösten Phagen um solche, die nicht in das Zellinnere eingedrungen waren, sondern sich nur extrazellulär an die Pilzzellwand angeheftet hatten. Diese extrazelluläre Bindung der Phagen muß so stark gewesen sein, daß die wiederholten Waschvorgänge sie nicht zu lösen vermochten. Eine andere Er-

klärungsöglichkeit wäre, daß während der Behandlung mit Glucuronidase ein Teil der Neurosporazellen platzte und dabei Phagen aus dem Zellinnern freigesetzt wurden.

Nach 1 tägiger Inkubation von heterokaryotischen tryp-1, his-1A/ ad-4 , his-1A Zellen mit einem  $\phi$ 80- $\lambda$ dhis/ Helferphagengemisch waren ca. 0,01% - 0,02% der ursprünglich dem Inkubationsmedium zugesetzten Phagen in Form von p.f.u. mit den Pilzzellen assoziiert. Um den Anteil der möglicherweise extrazellulär an die Pilzzellen gebundenen, aktiven Phagenpartikel zu erfassen, wurden die Zellen nach Inkubationsabschluß mit Phagenantiserum behandelt. Dabei bewirkte eine 30min. Behandlung die Inaktivierung von ca. der Hälfte der an Neurospora gebundenen p.f.u. (vgl. Tabelle 3). Eine Ausdehnung der Serumbehandlung auf 60 Minuten reduzierte diesen Anteil nicht weiter. Da das Serum im Überschuß zugegeben worden war bedeutet dies, daß nur extrazellulär gebundene Phagen inaktiviert wurden. Die Anzahl der p.f.u. wäre andernfalls bei Verlängerung der Serumbehandlung weiter vermindert worden.

Bei Neurosporazellen, die nach 1 tägiger Phageninkubation mit Enzym behandelt worden waren, betrug die Zahl der intrazellulären p.f.u. ca. 75% der insgesamt mit den Pilzzellen assoziierten Phagen, bei Zellen, die mit Phagenantiserum nachinkubiert worden waren, dagegen nur 57%. Dieser Unterschied könnte auf der Verwendung der verschiedenen Empfänger - bzw. Phagenstämme beruhen. Denkbar ist auch, daß nach beendeter Behandlung mit Antiserum letzteres nicht quantitativ entfernt wurde, sodaß nach Aufschluß der Zellen auch ein Teil der freigesetzten intrazellulären p.f.u. inaktiviert wurde..

Nach Berechnung der Anzahl intrazellulärer p.f.u. pro Neurosporazelle zeigte sich, daß nach 1 tägiger Inkubation mit  $\lambda$ ptrp-Phagen jede 10. - 1000. Zelle eine aktive Phagenpartikel enthielt, nach 2 tägiger Inkubation jede

5. - 250. Durch 2 tägige Inkubation konnte somit der Anteil an intrazellulären p.f.u. gesteigert werden. Bei 1 tägiger Inkubation mit einem  $\phi 80$ - $\lambda$ dhis/Helferphagengemisch wurde in jeder 70. - 400. Neurospora-Zelle ein p.f.u. nachgewiesen. Die starken Schwankungen lassen sich dadurch erklären, daß die Phagenaufnahme wahrscheinlich während der Fusionen zwischen den Pilzzellen erfolgt, ein Vorgang, der bei den einzelnen Versuchsansätzen mit unterschiedlicher Häufigkeit stattfinden dürfte.

Die relativ niedere Anzahl der intrazellulär nachgewiesenen Phagenpartikel könnte dadurch bedingt sein, daß beim Fusionsvorgang nur wenige Phagen in die Zellen eindringen können. Der Hauptgrund dürfte jedoch sein, daß mit der biologischen Nachweismethode alle die Partikel nicht erfaßt werden, die

- a) in die Zellen aufgenommen wurden, aber bereits im Inkubationsmedium ihre Plaquebildungsfähigkeit verloren hatten (vgl. C.1.1.),
- b) zwar in aktiver Form aufgenommen, dann aber intrazellulär inaktiviert wurden.

Für Punkt b) sprechen die in Abbildung 1 graphisch dargestellten Versuchsergebnisse, die eine kontinuierliche Abnahme an intrazellulären p.f.u. nach Inkubationsabschluß zeigen. Ein "efflux" aktiver Phagenpartikel scheidet als mögliche Ursache dieses Effektes aus, da im Inkubationsmedium keine p.f.u. nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse besagen weiter, daß, anders als bei den Experimenten von Bayreuther und Romig (1964), Abel und Trautner (1964) bzw. Sander (1967), zumindest im untersuchten Zeitraum von 5 Tagen, keine Produktion infektiöser Viruspartikel in dem für sie unspezifischen Wirt stattgefunden hat.

Die erste Voraussetzung für eine Expression der eingeschleusten Fremdinformation ist, daß letztere intrazellulär hochmolekular erhalten bleibt. In vitro Inkubationsversuche von 3 verschiedenen  $\lambda$  DNS-Formen mit Neurosporaextrakten gaben Aufschluß über die in den Pilzzellen zu erwartende Abbaurates. Es wurde gezeigt, daß diese von der DNS-Form abhängig ist. Nach 6 stündiger Inkubation waren ca. 80% der geschlossenen  $\lambda$  DNS-Ringmoleküle, aber nur ca. 20% der "Hershey circles" in säurelösliche Bestandteile zerlegt worden. Von der linearen  $\lambda$  DNS war noch etwa die Hälfte säurefällbar. Die ca. 20%ige Abbaurates bei den Inkubationsversuchen mit "Hershey circles" könnte folgendermaßen erklärt werden: Bei der Herstellung von "Hershey circles" wurden nur ca. 60% der linearen DNS-Moleküle in die Ringform übergeführt (vgl. Abbildung 3). 40% der dem Inkubationsgemisch zugesetzten DNS lagen demnach in linearer Form vor. Davon wurde die Hälfte (= 20%) zu säurelöslichem Material abgebaut. Dies würde bedeuten, daß ringförmige DNS-Moleküle nicht oder kaum von Neurosporanucleasen angegriffen werden. Allerdings gilt dies nur für entspannte, nicht aber für geschlossene Ringmoleküle, die in "supercoiled" Form vorliegen. Für deren hohe Abbaurates gibt es folgende Erklärungsmöglichkeit: In supercoiled DNS-Molekülen existieren Regionen, in denen keine oder nur schwache Wasserstoffbindungen zwischen den beiden DNS-Einzelsträngen bestehen. Diese Regionen können durch einzelstrangspezifische Endonucleasen, Enzyme, die u.a. auch in Neurosporamycelien nachgewiesen wurden (Linn und Lehman, 1965), geschnitten werden (Kato et al., 1973, Beard et al., 1973, Wang, 1974). Erfolgt in einem oder in beiden der DNS - Einzelstränge nur jeweils ein Schnitt, so entstehen entspannte Ringmoleküle, die im vorliegenden Fall, ebenso wie "Hershey circles", nicht weiter zu säurelöslichen Bestandteilen abge-

baut werden dürften. Die 80%ige Abbaurate kann nur damit erklärt werden, daß bei den in den Experimenten gegebenen Protein (Nucleasen) - und DNS-Konzentrationen, geschlossene Ring-DNS-Moleküle gleichzeitig an verschiedenen Stellen von einzelstrangspezifischen Endonucleasen angegriffen wurden. Der weitere Abbau der dabei entstandenen linearen DNS-Bruchstücke zu säurelöslichem Material wurde wahrscheinlich durch Exonucleasen durchgeführt. Die unterschiedlichen Abbauraten von hochmolekularer linearer DNS und DNS-Fragmenten sind damit zu erklären, daß durch das Zerlegen in Fragmente neue Angriffsstellen für Exonucleasen geschaffen wurden.

Der Abbau der verschiedenen DNS-Formen konnte durch die Zugabe von DEAE-Dextran nahezu vollständig unterbunden werden (vgl. Tabelle 5b). Dieser Effekt ist, wie Maes et al., 1967, vermuten, auf die Bindung des kationischen Glucosepolymers an die Phosphatkomponenten von Nucleinsäuren zurückzuführen.

Fragmentierte Neurospora-zellen nehmen freie DNS aus dem Inkubationsmedium auf (Szabó und Schablik, 1973). Die Tatsache, daß nach Inkubation von fusionierenden Neurospora-zellen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin-markierter  $\lambda$ DNS intrazellulär säureunlösliche Radioaktivität nachgewiesen werden konnte (vgl. Tabelle 6) deutet darauf hin, daß eine Aufnahme extrazellulärer DNS auch während der Heterokaryonbildung erfolgen kann. Die in den Neurospora-zellen nach 1 tägiger Inkubation nachgewiesene säureunlösliche Radioaktivität betrug ca. 10% der ursprünglich dem Medium zugesetzten. Zu berücksichtigen ist dabei allerdings, daß freie DNS im Kulturmedium durch extrazelluläre Nucleasen zerlegt wird (Hasunuma, 1973). Die intrazellulär gefundene Radioaktivität könnte somit auf der Aufnahme  $^3\text{H}$ -markierter Thymidin-Nucleotide beruhen. Da jedoch der extrazelluläre DNS-Abbau

durch die kombinierte Zugabe von EDTA, TMP und DEAE-Dextran bis auf ca. 5% unterbunden werden konnte (vgl. Tabelle 4) und ferner die Aufnahme der  $^3\text{H}$ -Thymidin-markierten Nucleotide durch kompetitive Hemmung auf Grund des zugesetzten unmarkierten TMP erschwert sein sollte, ist dieser Denkmöglichkeit wenig Bedeutung beizumessen.

Der größte Teil (ca. 74%) der intrazellulär nachgewiesenen Radioaktivität (säurelöslich und säureunlöslich) wurde im Zytoplasma gefunden. Ca. 25% waren mit den Kernen assoziiert, ca. 1,5% mit den Mitochondrien (vgl. Tabelle 7). Unklar ist, ob die im Zytoplasma gemessene Radioaktivität von intakter Phagen-DNS oder DNS-Fragmenten herrührte. Ebenso wenig konnte ermittelt werden, in welcher Form die  $^3\text{H}$ -markierte Spender-DNS an die Kerne und Mitochondrien gebunden war. Denkbar ist eine unspezifische Assoziation von hochmolekularer DNS oder auch von DNS-Fragmenten an diese beiden Zellkomponenten. Möglich ist auch ein Einbau sowohl von hochmolekularer, als auch von abgebauter Phagen-DNS in das karyotische bzw. mitochondriale Empfänger-genom. Eine Entscheidung zwischen den angegebenen Möglichkeiten, durch Trennung von Spender und Empfänger-DNS mittels CsCl-Dichtezentrifugation, konnte, auf Grund der gleichen Dichten der beiden DNS-Spezies (vgl. Abbildung 6), nicht getroffen werden. Hier würden Versuche mit dichtemarkierter Phagen -DNS (BU) weiter führen.

Nach Behandlung von *Neurospora tryp-1* Mutanten mit  $\lambda$ ptrp-Phagen bzw. deren DNS konnten in 18 von 53 Experimenten phänotypisch tryptophanprototrophe Kolonien isoliert werden. Als mögliche Ursachen dieses Effektes können in Erwägung gezogen werden:

- 1.) Spontane Reversion (echte Rückmutation des *tryp-1* Markers oder kompensierende Suppressormutation);

- 2.) Wildtypkontamination;
- 3.) induzierte Suppressormutation, hervorgerufen durch Integration der Spender-DNS oder von DNS-Bruchstücken an geeigneten Stellen des Neurospora-genoms;
- 4.) Expression der übertragenen bakteriellen Tryptophangene.

Spontane Reversion scheidet als Hauptursache aus, da für die Experimente try<sup>p</sup>-1 Mutanten mit einer Reversionsrate kleiner  $2 \times 10^{-9}$  verwendet wurden, try<sup>p</sup><sup>+</sup>-Kolonien jedoch mit einer Häufigkeit von  $0,1 - 5 \times 10^{-7}$  auftraten (vgl. Tabellen 9a und 9b). Gegen eine spontane Reversion spricht auch das Fehlen von try<sup>p</sup><sup>+</sup>-Kolonien bei den Kontrollversuchen mit Puffer,  $\lambda$ plac- und Wildtyp-Phagen bzw. deren DNS. Die negativen Kontrollen sind ferner ein Hinweis darauf, daß Wildtypkontaminationen weitgehend ausgeschlossen werden können. try<sup>p</sup><sup>+</sup>-Kolonien scheinen vielmehr erst nach Behandlung mit Phagen oder Phagen-DNS zu entstehen. Falls induzierte Suppressormutationen für den Effekt verantwortlich sind, sollten try<sup>p</sup><sup>+</sup>-Kolonien nicht nur nach Behandlung mit  $\lambda$ p<sub>trp</sub>-Phagen oder deren DNS auftreten, sondern auch bei den Kontrollexperimenten, die mit  $\lambda$ plac- und Wildtyp-Phagen bzw. -DNS durchgeführt wurden. Obwohl dies nicht der Fall war, sind Suppressormutationen dennoch nicht auszuschließen, da diese Kontrollinkubationen jeweils nur 3 mal angesetzt wurden. Es ist also die Wahrscheinlichkeit dabei try<sup>p</sup><sup>+</sup>-Kolonien zu erhalten gering. Es hatte sich nämlich gezeigt, daß bei Behandlung mit  $\lambda$ p<sub>trp</sub>-Phagen bzw.  $\lambda$ p<sub>trp</sub>-DNS nur 45% bzw. 18% der Experimente erfolgreich waren. Auf das Problem der induzierten Suppressormutation wird später noch näher eingegangen.

Die niederen Erfolgsquoten, die mit isolierter DNS erreicht wurden, könnten darauf zurückzuführen sein, daß ein großer

Teil der DNS-Moleküle bereits im Kulturmedium bzw. nach Eintritt in die Pilzzellen durch die Einwirkung von Neurosporanucleasen in biologisch nicht mehr aktive Bruchstücke zerlegt wurde. Dagegen wurde das Spendergenom in den Phagenpartikeln zumindest eine gewisse Zeit vor dem Angriff von Nucleasen geschützt. Im Gegensatz dazu erzielten Horst und Mitarbeiter (1975) bei menschlichen Hautfibroblasten mit defekter  $\beta$ -Galaktosidase bessere Erfolge, wenn sie mit DNS inkubierten. So konnte nach  $\lambda$ plac-DNS-Behandlung bei 25% der Versuche in den Fibroblasten  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden, nach Behandlung mit  $\lambda$ plac-Phagen jedoch nur bei 15%.

Die geringen Erfolgsraten, die bei Neurospora mit  $\lambda$ p<sub>trp</sub>-Phagen und  $\lambda$ p<sub>trp</sub>-DNS-Behandlung erzielt wurden, sind verständlich, wenn man eine phänotypische Expression der bakteriellen Tryptophangene in den tryptophanauxotrophen Neurosporazellen annimmt, da in diesem Fall eine Reihe von Forderungen erfüllt werden müssen: So sollte nach dem Eintritt der Spender-DNS-Moleküle in die Empfängerzellen wenigstens ein Teil dieser Moleküle modifiziert werden, damit kein Abbau durch neurospora-eigene Nucleasen erfolgt und die biologische Aktivität erhalten bleibt. Transkription und Translation der Spenderinformation müssen mit empfangereigenen Enzymen durchgeführt werden können. Die dabei gebildeten Genprodukte müssen in dem für sie unspezifischen Zellmilieu funktionsfähig sein und in ausreichender Konzentration vorliegen. Ferner dürfen neben den interessierenden Genprodukten keine für den Empfängerorganismus letalen gebildet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß nach Inkubation von Wildtypmycelien mit  $\lambda$ p<sub>trp</sub>-Phagen die Keimungsrate der aus diesen Mycelien gebildeten Konidien gegenüber den Pufferkontrollen auf Minimalmedium deutlich reduziert war (vgl. Tabelle 19). Dieser "unspe-

zifische Phageneffekt" könnte darauf zurückzuführen sein, daß phagenspezifische Genprodukte gebildet wurden, die für Neurospora toxisch waren. Einen Hinweis darauf, daß bei interspezifischen Genübertragungen mittels transduzierender Phagen nicht nur die bakteriellen, sondern auch die phageneigenen Gene abgelesen werden können, lieferten die RNS-DNS-Hybridisierungsversuche von Merrill et al. (1971). Die verminderte Keimungsrate könnte auch durch unspezifische Integration der Spender-DNS oder Bruchstücken davon, in essentielle Neurosporangene bewirkt worden sein.

Die Bildung toxischer Phagenprodukte bzw. Mutation des Neurosporenoms durch willkürliche Integration der Phagen-DNS könnten eine mögliche Erklärung für die negativen Inkubationsversuche sein. Letztere könnten aber auch darauf zurückzuführen sein, daß in einigen Fällen die bakteriellen Gene zwar exprimiert, aber nicht repliziert wurden. In diesem Fall würden keine makroskopisch sichtbaren  $\text{tryp}^+$ -Kolonien entstehen. Zu berücksichtigen ist ferner, daß bei den Experimenten durch die angewandte Selektionsmethode nur tryptophanprototrophe Konidien, aber keine tryptophanprototrophen Mycelzellen erfaßt wurden.

Die nach  $\lambda\text{ptrp}$ -Phagen - und  $\lambda\text{ptrp}$ -DNS-Behandlung erhaltenen  $\text{tryp}^+$ -Isolate konnten unterteilt werden in: instabile  $\text{tryp}^+$ -Isolate, heterokaryotische, stabile  $\text{tryp}^+$ -Isolate und homokaryotische, stabile  $\text{tryp}^+$ -Isolate. Die stabilen Isolate zeigten teils extrakaryotische, teils karyotische Vererbung des tryptophanprototrophiebedingenden Markers. Bei den Isolaten mit karyotischer Vererbung des  $\text{tryp}^+$ -Markers konnte weiter unterschieden werden zwischen solchen, bei denen der Marker auf Kopplungsgruppe III

( der Kopplungsgruppe des tryp-1 Locus) und solchen , bei denen er auf einer der übrigen 6 Kopplungsgruppen lokalisiert war.

Eine mögliche Erklärung für die Instabilität der Tryptophanprototrophie bei 20 von 58 untersuchten Isolaten wäre das Exosomenmodell, das von Fox und Mitarbeitern (1970) aufgestellt wurde. Ihm zufolge wären im vorliegenden Fall die prototrophiebedingenden Gene - die bakteriellen Tryptophangene - nicht in die Linearstruktur der Neurosporachromosomen integriert, sondern mit homologen Chromosomenabschnitten assoziiert. Dabei könnten alternativ die Empfänger oder die assoziierten Spendergene , die auch als Exosomen bezeichnet werden, transkribiert werden, sodaß neben prototrophen Zellen auch auxotrophe auftreten. Eine andere Denkmöglichkeit wäre, daß Exosomen bei mitotischen und meiotischen Teilungsvorgängen eliminiert werden. Dies würde die Tatsache erklären, daß nach Kreuzung der noch tryp<sup>+</sup>-Ausgangs isolate mit der Mutante tryp-1 nur tryptophanauxotrophe Ascosporen gefunden wurden (vgl. Tabelle 11).

Jede tryptophanprototrophe Kolonie ist auf eine phänotypisch tryptophanprototrophe Konidie zurückzuführen. Konidien besitzen bei Neurospora im Durchschnitt 2-3 Kerne. Enthalten nicht alle Kerne einer Konidie die tryp<sup>+</sup>-Information, so entstehen heterokaryotische Mycelien, die neben tryptophanprototrophen Konidien auch auxotrophe abschnüren. Dies war bei 19 der 38 untersuchten stabilen tryp<sup>+</sup>-Isolaten der Fall: Die Isolate zeigten bei Plattierung ihrer Konidien auf Medium mit bzw. ohne Tryptophan unterschiedliche Keimungsraten. Heterokaryotische Isolate traten auch bei Szabó und Mishra (1975) nach Behandlung von inos<sup>-</sup> Neurosporazellen mit Neurosporawildtyp-DNS auf.

Bei Anzucht dieser Heterokaryen auf inosinsupplementiertem Medium nahm der Anteil an phänotypischen inos<sup>+</sup>-Zellen ab. Dieser Effekt wurde bei den 3 diesbezüglich geprüften heterokaryotischen trypt<sup>+</sup>/trypt<sup>-</sup>-Isolaten nicht beobachtet. Der Anteil an trypt<sup>+</sup>-Zellen blieb konstant, gleichgültig ob die Anzucht auf tryptophansupplementiertem oder unsupplementiertem Medium erfolgte (vgl. Tabelle 14). Auch bei der vegetativen Subkultivierung dieser Isolate wurde keine anteilmäßige Veränderung der trypt<sup>+</sup>-Zellen beobachtet (vgl. Tabelle 13).

Unterschiedliche Keimungsraten bei differentieller Plattierung auf Medium +/- Tryptophan deuten zwar auf das Vorliegen von Heterokaryen hin, könnten aber auch auftreten, wenn der trypt<sup>+</sup>-Marker extrakaryotisch vererbt wird. Diese Denkmöglichkeit konnte bei den 19 untersuchten Isolaten ausgeschlossen werden, da alle eine Mendelsche Vererbung des trypt<sup>+</sup>-Markers zeigten. Dieser Befund ist ferner ein Hinweis darauf, daß der trypt<sup>+</sup>-Marker stabil in das Neurospora-Genom integriert wurde.

Isolate, die bei differentieller Plattierung auf tryptophansupplementiertem und unsupplementiertem Medium in etwa gleiche Keimungsraten aufwiesen, wurden als homokaryotisch bezeichnet, obwohl eine Lokalisation des trypt<sup>+</sup>-Markers auf einem Plasmid ebenfalls zu diesen Ergebnissen führen könnte.

Durch Kreuzungsexperimente, unter Verwendung der homokaryotischen trypt<sup>+</sup>-Isolate als protoperithezienbildende Partner, wurde gezeigt, daß ein Teil der Isolate eine nicht Mendelsche Aufspaltung bezüglich des trypt<sup>+</sup>-Markers aufwies. Für dieses Ergebnis könnten unterschiedliche Keimungsraten der trypt<sup>+</sup> und trypt<sup>-</sup> Ascosporen verantwortlich sein. Die andere Möglichkeit wäre eine extrakaryotische

Vererbung der Tryptophanprototrophie. Da bei *Neurospora* beim Befruchtungsvorgang nur der Kern des männlichen Kreuzungspartners in die weibliche Zelle eindringt, konnte durch reziproke Kreuzungen, unter Verwendung der  $\text{tryp}^+$ -Isolate als männliche Partner, eine Entscheidung zwischen den beiden Alternativen getroffen werden. Eine hier ebenfalls anormale Aufspaltung spricht für eine unterschiedliche Keimungsrate der Ascosporen. Treten nur  $\text{tryp}^-$ -Sporen auf (0:8 Aufspaltung), so zeigt dies eine extrachromosomale Vererbung des  $\text{tryp}^+$ -Markers an. Letzteres traf für 8 der 9 untersuchten Isolate zu (vgl. Tabelle 17). Extrachromosomal vererbte Marker können sowohl auf der mitochondrialen DNS als auch auf Plasmiden lokalisiert sein. In den vorliegenden Fällen ist die 2. Möglichkeit gut denkbar. Intakte  $\lambda$ DNS-Moleküle könnten in den *Neurospora*-Zellen, ähnlich wie sonst in ihrem natürlichen Wirt *E. coli*, durch Paarung der homologen "sticky ends" und anschließende Verknüpfung der "nicks" durch wirtseigene Ligase in kovalent geschlossene Ringe - Plasmide - übergeführt werden.

Nach Kreuzung der Mendelsch aufspaltenden Isolate mit dem Wildtyp erwiesen sich in 6 Fällen ca. 1/4 der Ascosporen als tryptophanauxotroph (vgl. Tabelle 18b). Diese Rekombinanten können nur dadurch entstanden sein, daß der prototrophiebedingende Marker nicht in die Kopplungsgruppe des  $\text{tryp-1}$  Locus (Kopplungsgruppe III), sondern in eine der übrigen 6 integriert wurde.

Wie bereits erwähnt, könnten die nach  $\lambda\text{ptrp}$ -Phagen bzw.  $\lambda\text{ptrp}$ -DNS-Behandlung entstandenen Kolonien auf spontane Reversion, Wildtypkontamination, Suppressormutation oder Expression der bakteriellen Tryptophangene zurückzuführen sein. Bei allen Isolaten, die sich bezüg-

lich der Tryptophanprototrophie als instabil erwiesen, können spontane Reversion, Wildtypkontamination und Suppressormutation ausgeschlossen werden. Das gilt auch für die Isolate mit extrachromosomaler Vererbung des  $\text{tryp}^+$ -Markers. Eine Expression der bakteriellen Gene ist in diesen Fällen wahrscheinlich.

Bei allen heterokaryotischen Isolaten und allen Isolaten mit nicht auf Kopplungsgruppe III lokalisiertem  $\text{tryp}^+$ -Marker scheidet Wildtypkontamination aus. Bei allen übrigen Isolaten könnte diese Möglichkeit, aber auch spontane Reversion in einigen Fällen die Tryptophanprototrophie verursacht haben. Die anderen zu diskutierenden Denkmöglichkeiten sind induzierte Suppression und Expression der integrierten bakteriellen Erbinformation.

Suppressormutationen könnten durch Integration von Phagen-DNS oder Bruchstücken davon, induziert werden. Denkbar wäre, daß dadurch in den  $\text{tryp-1}$  Neurosporamutanten Enzyme gebildet werden, die zwar dem Wildtypgenprodukt des  $\text{tryp-1}$  Genes unähnlich sind, aber dessen Enzymaktivität besitzen (Rachmeler, 1967). Bei Neurospora wurde eine Reihe von Suppressormutanten isoliert und ihr Mutationsort kartiert. Seale et al. (1969) und Chalmers et al. (1971) zeigten, daß bestimmte Mutationen im  $\text{tryp-1}$  Locus durch eine dieser Mutationen, lokalisiert auf Kopplungsgruppe VII, supprimiert werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete  $\text{tryp-1}$  Mutante konnte jedoch durch keine der bisher getesteten Suppressormutationen kompensiert werden. Denkbar ist, daß durch die Integration der Fremd-DNS neue, bisher noch nicht beobachtete Suppressormutationen erzeugt wurden. Diese Mutationen könnten der zu supprimierenden Mutation nahe benachbart, aber auch auf einer anderen Kopplungsgruppe lokalisiert sein. Die erste Möglichkeit würde für alle  $\text{tryp}^+$ -Isolate zutreffen, bei denen nach Kreu-

zung mit dem Wildtyp nur  $\text{tryp}^+$ -Ascosporen auftraten. Die 2. Möglichkeit wäre bei den Isolaten gegeben, die bei dieser Kreuzung rekombinante  $\text{tryp}^-$ -Sporen bildeten.

Die Induktion von Suppressormutationen könnte bereits durch Integration kleiner unspezifischer Phagen-DNS-Bruchstücke ermöglicht werden. Postuliert man eine Expression der bakteriellen Tryptophangene, so muß hier die Integration ganz definierter Gene, der Gene E, D und C, stattgefunden haben, da deren Genprodukte die Reaktionen katalysieren, für die in *Neurospora* das  $\text{tryp-1}$ -Genprodukt zuständig ist. Der Einbau könnte durch Rekombinations- oder durch Integrationsprozesse erfolgt sein. Rekombination dürfte nicht wahrscheinlich sein, da im *Neurospora*-Genom in diesem Fall eine diesen 3 gekoppelten Genen annähernd homologe Stelle existieren müßte. Eine Integration der DNS nach einem der Prophagenintegration ähnlichem Mechanismus wäre denkbar, da Shimada et al. (1972) zeigen konnten, daß dieser Vorgang auch möglich ist, wenn die Einbaustelle für die Phagen-DNS im *E. coli* Chromosom fehlt. Die Integration der Spender-DNS könnte ebenso, wie vorher im Fall von Suppressormutationen erläutert, in der Nähe des  $\text{tryp-1}$  Locus oder auf einer anderen Kopplungsgruppe stattgefunden haben.

Da sowohl Suppressormutationen, als auch die Expression der bakteriellen Tryptophangene in *Neurospora* bei genetischen Kreuzungsanalysen zu phänotypisch gleichen Ergebnissen führen, kann eine endgültige Entscheidung zwischen den beiden Alternativen erst durch die Anwendung biochemischer Untersuchungsmethoden herbeigeführt werden.

## E. ZUSAMMENFASSUNG.

An Hand des Modellsystems *Neurospora crassa* / transduzierender Phage wurden Aufnahme, Funktionsfähigkeit und Verbleib prokaryotischer Erbinformation in eukaryotischen Zellen untersucht.

1. Nach Inkubation von fusionierenden Neurosporazellen mit Bakteriophagen konnten aktive Phagenpartikel (p.f. u.) in den Pilzzellen nachgewiesen werden.

2. Die Konzentration der intrazellulären p.f.u. nahm nach Inkubationsabschluß im untersuchten Zeitraum von fünf Tagen kontinuierlich ab.

3. Bei in vitro Inkubationsversuchen von  $^3\text{H}$ -markierter Phagen-DNS (linear, "Hershey circles", geschlossen circular) in *Neurospora*-Roheextrakten, wurden geschlossene, circuläre DNS-Moleküle am stärksten, "Hershey circles" am wenigsten zu säurelöslichem Material abgebaut. Durch Zugabe von DEAE-Dextran wurde bei allen drei DNS-Formen die Abbaurate reduziert.

4. Nach eintägiger Inkubation von Neurosporazellen mit  $^3\text{H}$ -markierter Phagen-DNS lagen ca. 10% der zugesetzten Radioaktivität intrazellulär in säurefällbarer Form vor. Der Hauptanteil der intrazellulären Radioaktivität wurde im Zytoplasma nachgewiesen. Die restliche  $^3\text{H}$ -Aktivität entfiel zum größten Teil auf die Kernfraktion, ein geringer Prozentsatz auf die Mitochondrienfraktion.

5. Nach Behandlung von tryp-1 Neurosporazellen mit  $\lambda$ trp-Phagen bzw. deren DNS traten bei 18 von 53 Experimenten tryptophanprototrophe Kolonien auf. Die entsprechenden Kontrollversuche waren negativ.

6. Bei 38 von 58 getesteten  $\text{tryp}^+$ -Isolaten blieb der  $\text{tryp}^+$ -Marker während der vegetativen Subkultivierung erhalten.

7. Die Hälfte der 38 stabilen  $\text{tryp}^+$ -Isolate erwies sich als heterokaryotisch bezüglich des  $\text{tryp}^+$ -Markers. Das Verhältnis von  $\text{tryp}^+$  zu  $\text{tryp}^-$  Zellen dieser Isolate blieb bei vegetativer Subkultivierung konstant.

8. Bei ca. 25% der stabilen  $\text{tryp}^+$ -Isolate konnte durch Kreuzungsanalysen eine extrachromosomale Vererbung des  $\text{tryp}^+$ -Markers nachgewiesen werden. Die übrigen Isolate zeigten, außer einigen sterilen Isolaten, eine Mendelsche Vererbung.

9. Rückkreuzungen mit dem Wildtyp zeigten, daß bei ca. 25% der Isolate mit chromosomaler Vererbung des  $\text{tryp}^+$ -Markers, dieser nicht auf Kopplungsgruppe III (=Kopplungsgruppe des  $\text{tryp-1}$  Locus) lokalisiert ist.

10. Als mögliche Ursache für das Auftreten von  $\text{tryp}^+$ -Kolonien nach Behandlung von *Neurospora tryp-1*-Stämmen mit  $\lambda\text{ptrp}$ -Phagen bzw. deren DNS werden die 2 Alternativen diskutiert: Expression der bakteriellen Erbinformation oder Erzeugung von Suppressormutationen. Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten kann erst nach biochemischer Analyse der  $\text{tryp}^+$ -Isolate getroffen werden.

11. Neben einem "spezifischen Phageneffekt" (Heilung von Auxotrophien) wurde auch ein "unspezifischer" beobachtet, der sich in einer Verminderung der Keimungsrate phagenbehandelter *Neurospora*-zellen äußerte.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abel, P. & Trautner, T.A. (1964)  
Formation of an animal virus within a bacterium  
Z.Vererbungsl. 95, 66-72
- Ahmad, M., Khalil, M. Khan, N.A. & Mozmadar, A. (1964)  
Structural and functional complexity at the tryp-1  
locus in *Neurospora crassa*  
Genetics 49, 925-933
- Arroyo-Begovich, A. & De Moss, J.A. (1973)  
The isolation of the components of the anthranilate  
synthetase complex from *Neurospora crassa*  
J.Biol.Chem. 248, 1262-1267
- Bayreuther, K.E. & Romig, W.R. (1964)  
Polyoma Virus: Production in *Bacillus subtilis*  
Science 146, 778-779
- Beadle, G.W. & Tatum, E.L. (1941)  
Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*  
Proc.Nat.Acad.Sci. 27, 499-506
- Beard, P., Morrow, J.F. & Berg, P. (1973)  
Cleavage of circular, superhelical Simian Virus 40 DNA  
to a linear duplex by S<sub>1</sub> nuclease  
J.Virol. 12, 1303-1313
- Botstein, D. (1968)  
Synthesis and maturation of phage P 22 DNA  
J.Molec.Biol. 34, 621-641
- Burgi, E., & Hershey A.D. (1963)  
Sedimentation rate as a measure of molecular weight  
of DNA  
Biophys.J. 3, 309-321

Chalmers, J.H.Jr. & Seale, T.W. (1971)  
Supersuppressible mutants in *Neurospora*:  
mutants at the tryp-1 and tryp-2 loci affecting the  
structure of the multienzyme complex in the Tryptophan  
pathway  
Genetics 67, 353-363

Cozzarelli, N.R., Kelly, R.B. & Kornberg, A. (1968)  
A minute circular DNA from *Escherichia coli* 15  
Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 992-999

Doy, C.H., Gresshoff, P.M. & Rolfe, B.G. (1973 a)  
Biological and molecular evidence for the transgenosis  
of genes from Bacteria to plant cells  
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 723-726

Doy, C.H., Gresshoff, P.M. & Rolfe, B.G. (1973 b)  
Time-course phenotypic expression of *Escherichia coli*  
Gene Z following transgenosis in haploid *Lysopersicon*  
*esculentum* cells  
Nature New Biol. 244, 90-91

Fox, A.S. & Yoon, S.B. (1970)  
DNA-induced transformation in *Drosophila*:  
locus-specificity and the establishment of transformed  
stocks  
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1608-1615

Gaertner, F.H. & De Moss, J.A. (1969)  
Purification and characterisation of a multienzyme  
complex in the tryptophan pathway of *Neurospora crassa*  
J. Biol. Chem. 244, 2716-2725

Gellert, M. (1971)  
Assay of DNA ligase by covalent joining of  $\lambda$ -DNA mole-  
cules  
in Methods in Enzymology, Vol. 21D, Academic Press, New York  
and London, 326-333

Hasunuma, K. (1973)

Repressible extracellular nucleases in *Neurospora crassa*

Biochim. Biophys. Acta 319, 288-293

Hershey, A.D., Burgi, E. & Ingraham, L. (1963)

Cohesion of DNA molecules isolated from phage  $\lambda$

Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 748-755

Horowitz, N.H. (1947)

Methionine synthesis in *Neurospora*.

The isolation of Cystathionine

J. Biol. Chem. 171, 255-264

Horst, J., Kluge, F., Bayreuther, K. & Gerok, W. (1975)

Gene transfer to human cells: Transducing  $\lambda$ plac gene expression in GM<sub>1</sub>-gangliosidose fibroblasts

Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3531-3535

Hütter, R. & De Moss, J.A. (1967)

Organization of the Tryptophan pathway: a phylogenetic study of the fungi

J. Bacteriol. 94, 1896-1907

Johnson, C.B., Grierson, D. & Smith, H. (1973)

Expression of  $\lambda$ plac 5 DNA in cultured cells of higher plant

Nature New Biol. 244, 105-106

Kammen, O.H. (1967)

Thymidine metabolism in *Escherichia coli*.

I. Factors involving utilization of exogenous Thymidine

Biochim. Biophys. Acta 134, 301-311

Kato,A.C., Bartok,K., Fraser,M.J. & Denhardt,D.T. (1973)  
Sensitivity of superhelical DNA to a single-strand  
specific endonuclease  
Biochim.Biophys.Acta 308, 68-78

Lhoas,P. (1972)  
Mating pairs of *Saccharomyces cerevisiae* infected with  
double stranded RNA viruses from *Aspergillus niger*  
Nature New Biol. 236, 86-87

Linn,S. & Lehman,J.R. (1965)  
An endonuclease from *Neurospora crassa* specific for  
polynucleotides lacking on ordered structure  
II. Studies of enzyme specificity  
J.Biol.Chem. 240, 1294-1304

Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L. & Randall.R.J.  
(1951)  
Protein measurement with folin phenol reagent  
J.Biol.Chem. 193, 265-275

Maes,R.,Sedwick,W. & Vaheri,A. (1967)  
Interaction between DEAE-Dextran and nucleic acids  
Biochim.Biophys.Acta 134, 269-276

Mannocha,M.S. & Colvin,J.R. (1967)  
Structure and composition of cell wall of  
*Neurospora crassa*  
J.Bacteriol. 94, 202-212

Matile , P. (1964)

Die Funktion proteolytischer Enzyme bei der Proteinaufnahme durch *Neurospora crassa*

Naturwissenschaften 51,489-490

Matile,P. (1965)

Intrazelluläre Lokalisation proteolytischer Enzyme von *Neurospora crassa*.

I.Funktion und subzelluläre Verteilung proteolytischer Enzyme

Z.Zellforsch.65, 884-896

Matile,P. (1967)

Secretion of proteolytic enzymes.

Porosity of the cell wall as related to the secretion of proteolytic enzymes

*Neurospora* Newsletters 12,6-7

Merril,C.R.,Geier,M.R. & Petricciani,J.C. (1971)

Bacterial virus gene expression in human cells

Nature 233,398-400

Munkres,K.D.,Munkres.M.N.,Greene,P.,Hedman,S.,Andrews,B.J., Holland,G. & Woodward,D.O. (1966)

Isolation of subcellular fractions of *Neurospora* mycelia.

*Neurospora* Newsletters 9, 14-15

Rachmeller,M.(1967)

Altered protein formation as a result of suppression in *Neurospora crassa*

J.Bacteriol.93, 1863-1868

Sander ,E.M, (1967)

Alteration of fd phage in tobacco leaves

Virology 33, 121-130

- Schildkraut, C.L., Marmur, J. & Doty, F. (1962)  
Determination of the base composition of deoxy-  
ribonucleic acid from its buoyant density in CsCl  
J. Molec. Biol. 4, 430-443
- Seale, T., Case, M. & Barratt, R.W. (1969)  
Supersuppressors in *Neurospora crassa*  
Neurospora Newsletters 15, 5
- Shimada, K. & Weisberg, R.A. (1972)  
Prophage Lambda at unusual Chromosomal Locations.  
I. Location of the secondary attachment sites and  
the properties of the lysogens  
J. Molec. Biol. 63, 483-503
- Szabo, G. & Schablik, M. (1973)  
DNA uptake by *Neurospora crassa*  
Neurospora Newsletters 20, 27-28
- Szabo, G. & Schablik, M. (1975)  
Heterokaryosis in DNA-induced inositol-independent  
hyphae of *Neurospora crassa*  
Neurospora Newsletters 22, 11-12
- Vinograd, J. (1963)  
Sedimentation equilibrium in a buoyant density  
gradient  
in Methods in Enzymology 6, Academic Press New York  
and London, 854-871
- Vogel, H.J. (1956)  
A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N.)  
Microbiol Genet. Bull. 13, 42-43

Wang, J.C. (1974)

Interactions between twisted DNAs and enzymes:  
the effect of superhelical turns

J.Molec.Biol. 87, 797-816

Westergaard, M. & Mitchell, H.K. (1947)

Neurospora.

V. A synthetic medium favouring sexual reproduction

Amer. J. Bot. 34, 573-577

Young, E.T. & Sinsheimer, R.L. (1964)

Novel intra-cellular forms of Lambda DNA

J.Molec.Biol. 10, 562-564

Young, E.T. & Sinsheimer, R.L. (1967)

Vegetativ bacteriophage  $\lambda$  DNA

II. Physical charakterisation and replication

J.Molec.Biol. 30, 165-200

Zinder, N.D. & Lederberg, J. (1952)

Genetic exchange in Salmonella

J.Bacteriol. 64, 679-699

Am Ende dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Klingmüller für die Anregung zu dieser Arbeit und die Beratung während der Versuchsdurchführung herzlich danken.

Mein Dank gilt ferner:

Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die Möglichkeit diese Arbeit am Genetischen Institut der Universität durchführen zu können;

Herrn Dr. P. Bachmann und Herrn Dr. G. Jensch für die Hilfe bei der Herstellung von Phagenantiserum;

Frau D. Sell für die gewissenhafte Assistenz bei der Durchführung eines Teils der Versuche; ihr und Frau R. Reimer für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen und Photographien.

Der Universität München danke ich für die Bewilligung eines Graduiertenstipendiums.

## Lebenslauf:

Am 21.1.1948 wurde ich als Tochter des Hauptlehrers Heinrich Teifel und seiner Ehefrau Maria, geb. Wandinger, in Kirchweidach, Kreis Altötting, geboren. Von 1954-1960 besuchte ich die Volksschule in Kirchweidach und wechselte dann auf das Pestalozzi-Gymnasium in München über, wo ich 1967 das Abitur ablegte. Anschließend studierte ich an der Ludwig - Maximilians - Universität München Biologie und Chemie. In diesen Fächern bestand ich 1972 das Staatsexamen für das höhere Lehramt. Ab Januar 1973 arbeitete ich am Genetischen Institut der Universität München, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Klingmüller, an der vorliegenden Arbeit.





